

薬物の乳汁移行性評価に関する研究

甲第31号

木村 聡一郎

# 薬物の乳汁移行性評価に関する研究

木村 聡一郎

# 目 次

	pp
総論の部	1
緒言	1
第一編 薬物の乳汁移行性を評価するための新規薬物動態学モデルの構築と提案	5
第一章 理論	6
第一節 乳腺構造に基づいた乳汁中への薬物排泄モデルの構築	6
第二節 薬物の乳汁中排泄量と乳汁産生速度を用いた乳汁中濃度の算出法	9
第三節 乳汁中对血漿中薬物濃度比、乳汁中および血漿中薬物濃度の理論式の誘導	10
第四節 繰り返し投与時の乳汁中および血漿中薬物濃度の算出法	12
第二章 臨床データの収集と解析	13
第一節 臨床データの収集	13
第二節 臨床データの解析法と適切なモデルの選択法	13
第三節 低次モデルの構築と利用	15
第三章 乳汁中および血漿中薬物濃度推移のシミュレーションと臨床データの解析	18
第一節 乳汁中および血漿中濃度推移のシミュレーションによる M/P <sub>ss</sub> の有用性	18
第二節 フィッティング分析による薬物の乳汁移行性評価	19
第四章 乳児の薬物曝露を最小化するための服用方法および授乳スケジュールのシミュレーション解析 －Cimetidine 服用患者の例－	27

第五章 小括および考察	29
第二編 ヒト乳腺上皮細胞を用いた in vitro 乳汁移行性評価モデルの構築	31
第一章 Trypsin 処理を応用したヒト乳腺上皮細胞培養法に関する検討	33
第一節 ヒト乳腺上皮細胞単層膜の形態学的特徴	34
第二節 経上皮抵抗値に対する trypsin 処理の影響	35
第三節 $\beta$ -casein の発現に対する trypsin 処理の影響	37
第四節 単層膜を介したモデル薬物の輸送方向性の検討	38
第五節 単層膜を介した vectorial transport に関与するトランスポーターの発現	40
第二章 培養ヒト乳腺上皮細胞の乳汁移行性評価モデルとしての有用性評価 一薬物の乳腺上皮細胞を介した輸送における担体の関与と pH 依存性に関する検討一	42
第三章 小括および考察	47
結論	51
謝辞	53
付録	54
実験の部	61
第二編の実験の部	61
引用文献	67

# 総 論 の 部

## 緒 言

母乳は、乳児にとって栄養効率の優れたものであり、<sup>1, 2)</sup> 母乳育児には、多くの疫学調査により健康、栄養、免疫、発育、心理、社会、経済、そして環境といった幅広い領域に対する利点を有すると報告されている。<sup>3)</sup> 特に乳児の健康面に対する利点が数多く報告されており、完全母乳育児、すなわち人工乳を併用しない母乳のみによる育児は、乳児での多くの疾患に対する予防効果を有することから、<sup>4)</sup> アメリカ小児科学会をはじめ、保険機関等は少なくとも6ヵ月間の完全母乳育児を推奨している。<sup>1, 5-8)</sup>

米国では、母乳育児を開始する割合は、1990年までに急激な上昇により51.5%に到達し、2001年には69.5%とさらに上昇しており、完全母乳育児の割合は46.0%前後の水準で推移している。<sup>9)</sup> また、出産後6ヵ月における授乳率および完全母乳育児の割合は、1990年から2001年にかけてそれぞれ17.6%から32.5%、および10.4%から17.2%へと上昇し、<sup>9)</sup> 6ヵ月間の母乳育児および完全母乳育児の重要性が社会的に認識されつつある。

一方で、授乳婦は、医薬品服用時において、母乳育児に対して極めて消極的になり、<sup>10)</sup> 授乳の回避を決断することが多い。それは、授乳婦の服用した薬物により、乳汁が汚染され、授乳を介して乳児がこれに曝露すると考えるためである。<sup>11-13)</sup> このような意識は、授乳婦のみならず、医療従事者にも共通している。ところが、授乳期間中には、ほぼすべての母親が薬物治療を必要としており、産後1週間では90%以上の母親が少なくとも1種類の医薬品を服用し、<sup>2, 14)</sup> さらに産後4ヵ月においても服用率は17%を示し、そのうちの5%の母親が慢性疾患に対する薬物治療を受けている。<sup>15)</sup>

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) において、三者間で調和された臨床試験の一般指針 E8 には、「授乳中の女性が投与対象となる薬剤であれば、その薬物の乳汁中への排泄について検討すべきであろう」と記載されている。<sup>16)</sup> しか

し、臨床の現場で授乳時の薬剤使用の可否を判断するために必要な情報は、開発段階および市販後以降の調査では得られておらず、わずかではあるが入手可能な情報としては、ヒトでの臨床試験ではなく、動物に臨床用量をはるかに上回る大量投与を実施し、乳汁中の薬物濃度を測定したものが多い。そのため、添付文書や医薬品インタビューフォームには、「乳汁中へ移行するので、(1) 治療上の有益性が危険性を上回る場合にのみ投与すること、あるいは(2) 授乳婦への投与は避けることが望ましいが、やむを得ず投与する場合は授乳を中止させること」といった内容が記載されているだけであり、薬物がどの程度乳汁中へ移行するかなど、乳児のリスクを推定するために必要な情報は含まれていない。

授乳婦の服薬による授乳を介した乳児のリスクを明らかにするためには、乳汁中薬物濃度、乳児の薬物摂取量、乳児の血中薬物濃度、および薬物に対する乳児の反応性を知る必要がある。

乳児のリスク評価の指標として、Exposure Index (EI) が提唱されており、体重あたりの母親の薬物服用量に対する乳児の薬物服用量比 ( $EI_{Dose}$ ; eq. 1) あるいは母親の平均血中濃度に対する乳児の平均血中濃度比 ( $EI_{Conc}$ ; eq. 2) として表される。<sup>17, 18)</sup>

$$EI_{Dose} = \frac{D^{Infant}}{D^{Maternal}} = \frac{F^{Maternal}}{CL^{Maternal}} \left( \frac{M}{P} \right) \left( \frac{V_{Milk}}{\tau} \right) \cdots \text{eq. 1}$$

$$EI_{Conc} = \frac{\bar{C}_{Plasma}^{Infant}}{\bar{C}_{Plasma}^{Maternal}} = \frac{F^{Infant}}{CL^{Infant}} \left( \frac{M}{P} \right) \left( \frac{V_{Milk}}{\tau} \right) \cdots \text{eq. 2}$$

$EI_{Dose}$  の算出には、母親のバイオアベイラビリティ ( $F^{Maternal}$ ) および全身クリアランス ( $CL^{Maternal}$ ) が必要であり、 $EI_{Conc}$  は、乳児のバイオアベイラビリティ ( $F^{Infant}$ ) および全身クリアランス ( $CL^{Infant}$ ) を必要とする。さらに両インデックスに共通して乳汁対血漿中薬物濃度比 (M/P) および一回の授乳あたりの母乳摂取量 ( $V_{Milk}/\tau$ ; 一日の母乳摂取量/授乳回数) を情報として入手しなければならない。しかし、M/P は、ほとんどの薬物で知られておらず、また M/P そのものの考え方にはつぎのような問題がある。

M/P は、血液から乳汁中への薬物の移行の程度を表す値であり、これに関する研究結果が in vivo 研究および in vitro 研究において報告されてきた。ヒトでの臨

床研究では、M/P の実測値が報告されているが、論文によって (1) 薬物を服用した授乳婦のある時間における血漿中濃度と乳汁中濃度を単純に比として表したもの ( $M/P_{conc}$ )、<sup>19)</sup> 血漿中濃度推移と乳汁中濃度推移を調べて (2) 平均濃度の比 ( $M/P_{ave\ conc}$ )、および (3) 血漿および乳汁の濃度－時間曲線下面積の比 ( $M/P_{AUC}$ ) として表されているものがあり、<sup>20-22)</sup> 単に M/P といっても文献によって異なり、算出法が統一されていない。他方、薬物の乳汁移行が受動拡散によって支配されていると仮定した in vitro 系での M/P 予測法が報告され、薬物の物理化学的特性に基づいた予測値が報告されてきた。<sup>23)</sup> しかし、それら値にもいくつかの問題点が挙げられる。

Wilson らは、血漿中薬物濃度推移と乳汁中薬物濃度推移は常にパラレルではなく、M/P は時間依存的に変化する値であり、一定値をとらないと報告しており、<sup>24)</sup> Wilson らのいう M/P とは (1) のような単純な濃度比であると考えられる。しかし、M/P が薬物の血液－乳汁間の分布特性の指標であると認識されていることを考慮すると、M/P を定数として表わすことにも有用性があり、 $M/P_{conc}$  を M/P として捉えるのではなく、動的特性値と位置づけ、別に、分布特性を特徴づけることのできる M/P を定義すべきである。(2) の場合では、算出される平均濃度はサンプリングの回数や時間により大きく異なる可能性があり、必ずしも正確な値を算出できているかについては疑問が残る。(3) の場合、これまでの論文に示されるモデル解析は、乳汁の分布容積の変化がないことを前提としているにもかかわらず、現実には採取された乳汁は、持続的な乳汁産生によって薬物が希釈された値であり、これを用いて解析されているため、妥当とはいえない。しかし、乳汁の分布容積が一定であるというモデルの前提に対しては妥当ではないものの、希釈後の値を用いて解析されているため、乳汁中薬物濃度の過大な見積もりが図らずも回避され、比較的妥当な値が算出される。ただし、実態とは異なるモデルであるため、正確な速度論パラメータの算出と薬物動態学的应用は困難である。

In vitro 系による予測値に関しては、近年、ヒト授乳期乳腺上皮細胞においてトランスポーターの発現が観察され、<sup>25)</sup> cimetidine や nitrofurantoin の乳汁中への移行に能動輸送系が関与していることが示唆されているので、<sup>21, 26)</sup> 薬物の乳汁移行を単純な受動拡散のみで捉えることは困難であると考えられるようになっている。そのため、受動拡散に加えて能動輸送の関与をも含めて予測を可能にす

る in vitro モデルの構築が必要である。

上述のように、乳汁移行性に関する考え方や報告値には多くの問題点があることから、著者は、正確に M/P を算出することが出来る解析モデル、および予測することが出来る in vitro モデルをそれぞれ構築することを最終目的とした検討を行なった。第一編では、in vivo データから、既存の臨床データを無駄にすることなく、正確な M/P を算出するために、乳汁排泄過程を組み込んだ薬物速度論モデルを構築し、血漿中濃度と乳汁中濃度の時間推移を求める式から、薬物速度論パラメータの関数としての M/P 算出法を考案した。そして、in vivo データの解析により得られた速度論パラメータから薬物の M/P を算出し、さらに cimetidine 服用患者を例として乳児の薬物曝露を最小化するための薬物の用法および授乳スケジュールをシミュレーションした。<sup>27)</sup> 第二編では、M/P 予測のための in vitro モデルを構築するための検討を行なった。しかし、これまでに能動輸送系を評価できるヒト乳腺上皮細胞を用いた in vitro 実験系は確立されていないため、まず、能動輸送系を評価できるヒト乳腺上皮細胞単層膜培養法の検討から出発した。<sup>28)</sup> そして、物質輸送の方向性、送担体の発現およびモデル薬物の輸送について調べ、予測系としての可能性について検討した。<sup>29)</sup>

以下、これらについて論述する。



# 第一編 薬物の乳汁移行性を評価するための新規薬

## 物動態学モデルの構築と提案

授乳婦が薬物を服用したときの授乳による乳児の薬物曝露を評価するためには、薬物の乳汁移行性に関する情報が必須である。これまでに、乳汁移行に関するヒトでの臨床研究がわずかながら報告され、血液中および乳汁中薬物濃度の経時変化が報告されている。しかし、妥当な薬物動態学的解析法がないことから、速度論パラメータの算出を含めた授乳婦の体内動態については検討されておらず、安全な母乳育児を行なうための母親への薬剤投与設計、あるいは授乳計画の策定に至る検討は行なわれていない。臨床現場の実情としては、M/P が報告されているものについては、これを用いてある程度の評価を行うが、先に述べたように M/P の算出法が様々であるため、それが正しく評価されているかについては多くの疑問が残る。そこで、統一した算出法により薬物の乳汁移行性を評価し、その指標である M/P と授乳婦の体内動態を関連付けた検討が必要である。

アメリカ食品医薬品局（FDA）は、授乳婦を対象とした臨床研究のドラフトガイダンスを発表している。<sup>30)</sup> このガイダンスは、授乳婦の乳汁中および血中濃度を測定して M/P および乳汁中濃度を評価することの必要性を述べたものである。ガイダンスの中で FDA は、授乳婦での体内動態パラメータを算出して授乳婦に推奨できる用法および用量の設定ならびに乳児の薬物曝露を最小にするための授乳スケジュールを提案できる解析方法の必要性を述べ、これには薬物動態学的コンパートメントモデルが妥当であるとの見解を示している。また、臨床試験の一般指針では、「授乳中の女性が投与対象となる薬剤であれば、その薬物の乳汁中への排泄について検討すべきであろう」と記載されており、<sup>16)</sup> 今後、授乳婦を対象とした臨床試験が行われる可能性がある。このことから臨床データを解析できる薬物動態モデルを構築することは極めて重要である。

本編の目的は、この解析に必要なモデルを構築し、そのモデルを用いた臨床データの解析によって種々薬物の M/P を求めること、および個々の患者の薬物治療に合わせた授乳計画あるいは薬物投与計画の策定を可能とすることである。

## 第一章 理論

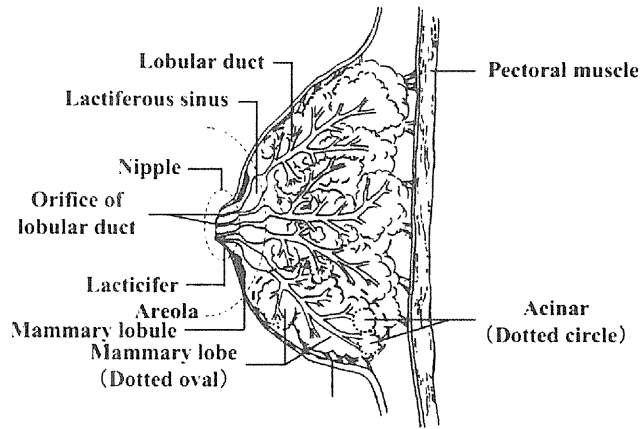
### 第一節 乳腺構造に基づいた乳汁中への薬物排泄モデルの構築

健常人において、多くの薬物の体内動態は、1-あるいは2-コンパートメントモデルで解析できることが知られている。<sup>31)</sup> そのため、授乳婦での体内動態は、健常人での動態を表現できるコンパートメントモデルに、授乳期に特異的な発達が見られる乳腺組織の機能を反映するプロセス、乳汁排泄過程を接続したモデルにより解析できると考えられる。

乳腺は、15 から 20 個の乳腺葉からなり、乳腺葉はさらに乳腺小葉、腺房へと分岐する (Fig. 1a)。乳汁は腺房で作られ、乳腺小葉の小腺管に集まり、乳管洞へ蓄積する。腺房の腺細胞は、乳腺上皮細胞とそれをバスケット状に包む筋上皮細胞から構成されており、さらに、その周囲を毛細血管が網状に覆っている (Fig. 1b)。授乳期に発達した乳腺組織の中で、乳腺上皮細胞は、乳汁の産生および血液と乳汁間の物質輸送において大きな役割を担っている。<sup>32, 33)</sup> すなわち、乳腺上皮を介した乳汁中への薬物の移行は、乳腺上皮細胞による乳汁の産生と腺腔への乳汁貯留に付随した現象であると考えられる。このことは、乳汁産生組織（プレストコンパートメント）の分布容積が乳汁の産生と授乳により逐次変化することを意味し、分布容積が定数である一般的なコンパートメントモデルの適用では、乳汁中薬物濃度の解析はできない。Wilson は、 $M/P_{conc}$  が時間依存的に変化することをコンパートメントモデルにより解析し、それが個々の薬物に固有の定数として扱うことはできないこと、および既存の臨床論文や物理化学的モデルの問題点を指摘した。<sup>24)</sup> しかし、この解析においても、プレストコンパートメント中の薬物の存在を濃度として扱うことはできていない。

そこで、著者は、プレストコンパートメントを乳汁および薬物が排泄される一次貯蔵コンパートメントと考え、薬物がペリフェラルコンパートメントからプレ

a



b

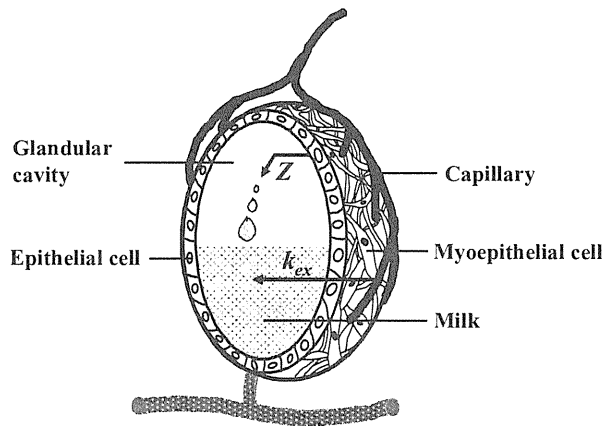


Fig. 1. Anatomic diagram of mammary gland (a) and mimetic diagram of acinar and putative phenomena involved in drug excretion into milk (b)

ストコンパートメント中へと排泄される過程, およびブレストコンパートメントに蓄積された乳汁が, 授乳または搾乳によって授乳婦の体外へと最終的に排泄される過程を組み合わせる乳汁排泄過程とした. そして, 前者の過程は, 乳腺上皮

細胞を介した乳汁中への薬物排泄現象とみなし、乳汁産生とは独立した一次の速度定数に従うと仮定した (Fig. 1b).

さらに、著者は、M/P を薬物動態学的に利用しやすい指標、つまり速度論パラメータを用いて表すことができる指標とするために、定速静注時の定常状態における乳汁中对血漿中薬物濃度比 (M/Pss) と定義した. これにより、M/Pss は、内服あるいは注射投与後の血中および乳汁中薬物濃度の解析により得られた速度論パラメータと乳汁産生速度 ( $Z$ ) の関数として表現できる.

そして、乳汁排泄過程を含む最も高次なモデルとして、Fig. 2 のようなセントラルコンパートメント、Peri. 2、薬物の乳汁排泄に関わらないペリフェラルコンパートメント (Peri. 3)、およびブレストコンパートメントからなる 4-コンパートメントモデルを構築し、種々の解析を行った. このモデルは、コンパートメン

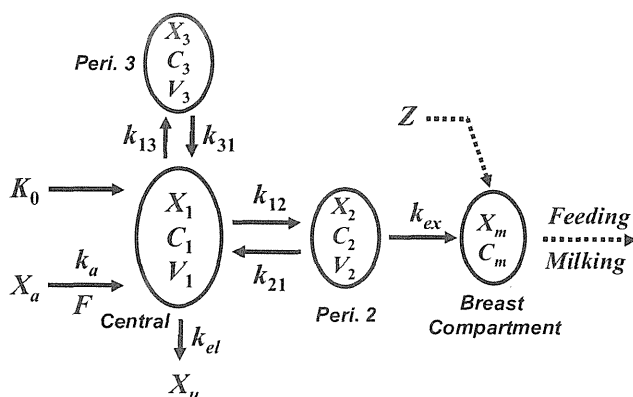


Fig. 2. A novel compartment model for the analysis of drug transfer into milk.

Nomenclature:  $C$ ; Concentration,  $X$ ; Drug amount,  $V$ ; Distribution volume,  $K_0$ ; Constant infusion rate,  $Z$ ; Milk production rate,  $F$ ; Absorption ratio,  $k$ ; Rate constant. Subscript:  $a$ ; absorption,  $el$ ; elimination,  $m$ ; Milk, 1; Central compartment, 2 and 3; Peripheral compartment.

Table 1. Abbreviation of novel pharmacokinetic models

Number of compartment	Administration	Excretion compartment	Abbreviation
4	Constant infusion	Peripheral	4-inf-P
4	Oral	Peripheral	4-po-P

ト数, 投与経路およびブレストコンパートメントに隣接するコンパートメント名を順に組み合わせて 4-po-P, あるいは 4-inf-P と命名した. 経口投与モデルが 4-po-P, M/Pss を求めるための定速静注モデルが 4-inf-P である (Table 1).

## 第二節 薬物の乳汁中排泄量と乳汁産生速度を用いた乳汁中濃度の算出法

乳腺上皮を介した薬物の乳汁中への移行は, 前述のように乳腺上皮細胞による乳汁の産生と腺腔への乳汁貯留に付随した現象である. 薬物が乳汁に隣接するコンパートメント (Peri. 2, Fig. 2) から薬物排泄速度定数  $k_{ex}$  で乳汁中へ排泄される場合, 乳汁中への累積薬物排泄量  $X_m$  は  $k_{ex}$  と隣接するコンパートメント中の薬物量  $X_2$  の関係式から算出できる (eq. 3). さらに, 乳汁中へ移行した薬物は, 乳汁産生速度  $Z$  の速さで希釈される. これより, 乳汁中薬物濃度  $C_m$  は, 前回の授乳終了後 ( $T_1$ ) から今回の授乳 ( $T_2$ ) までの間に血液中から乳汁中へ移行した薬物量をその時間内に産生された乳汁量で除することにより算出できる (eq. 4).

$$\frac{dX_m}{dt} = k_{ex} X_2 \quad \cdots \text{eq. 3}$$

$$C_m = \frac{X_m(T_2) - X_m(T_1)}{Z(T_2 - T_1)} \quad \cdots \text{eq. 4}$$

すなわち, 前述の Fig. 2 のコンパートメントモデルにおける  $X_2$  を算出する式を誘導し, これを上式に代入して解くことで  $C_m$  が得られる. また, 定速静注モデル (Fig. 2,  $K_0$  で投与時) の定常状態での  $C_m$  と定常状態血中薬物濃度  $C_1$  の比から M/Pss が得られる.

なお, 乳汁は一日に 800 mL 産生されることから, <sup>34)</sup> 本検討において乳汁産生速度は 33 mL/h として解析した.

### 第三節 乳汁中对血漿中薬物濃度比, 乳汁中および血漿中薬

#### 物濃度の理論式の誘導

定速静注したときの定常状態での乳汁中对血漿中薬物濃度比, すなわち M/Pss を算出するために 4-inf-P を, また, ある時間における血漿中濃度  $C_1$  (セントラルコンパートメント中の濃度) および乳汁中濃度  $C_m$  を算出するために 4-po-P を用いて以下に示す微分方程式をたてた. そして, M/Pss,  $C_1$  および  $C_m$  のそれぞれの理論式を導いた. 理論式の解法は巻末の付録に示す.

〈4-inf-P〉

$$\frac{dX_1}{dt} = K_0 - (k_{el} + k_{12} + k_{13})X_1 + k_{21}X_2 + k_{31}X_3$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}X_1 - (k_{ex} + k_{21})X_2$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{13}X_1 - k_{31}X_3$$

$$\frac{dX_m}{dt} = k_{ex}X_2$$

〈4-po-P〉

$$\frac{dX_a}{dt} = -k_aX_a$$

$$\frac{dX_1}{dt} = k_aX_a - (k_{el} + k_{12} + k_{13})X_1 + k_{21}X_2 + k_{31}X_3$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}X_1 - (k_{ex} + k_{21})X_2$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{13}X_1 - k_{31}X_3$$

$$\frac{dX_m}{dt} = k_{ex}X_2$$

以上の微分方程式を解法して得られた経口投与時の血中薬物濃度  $C_1$ 、乳汁中薬物濃度  $C_m$  および M/Pss の解を、それぞれ eq. 5、eq. 6 および eq. 7 に示す。 $C_1$  および  $C_m$  の理論式に含まれている  $\alpha$ 、 $\beta$ 、および  $\gamma$  は複数の速度定数のハイブリット速度定数である。

$$C_1 = \frac{FX_0k_a}{V} \left( \frac{(k_{ex} + k_{21} - k_a)(k_{31} - k_a)}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} e^{-k_a t} + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \alpha)(k_{31} - \alpha)}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} \right. \\ \left. + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \beta)(k_{31} - \beta)}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \gamma)(k_{31} - \gamma)}{(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right) \cdots \text{eq. 5}$$

$$C_m = \frac{FX_0k_a k_{ex} k_{12}}{Z(t_2 - t_1)} \left( \frac{k_{31} - k_a}{k_a(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} (e^{-k_a t_1} - e^{-k_a t_2}) + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} (e^{-\alpha t_1} - e^{-\alpha t_2}) \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \beta}{\beta(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} (e^{-\beta t_1} - e^{-\beta t_2}) + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} (e^{-\gamma t_1} - e^{-\gamma t_2}) \right) \cdots \text{eq. 6}$$

$$\text{M/Pss} = \frac{k_{ex} k_{12} V}{(k_{ex} + k_{21}) Z} \cdots \text{eq. 7}$$

eq. 7 より、M/Pss は、 $k_{ex}$ 、 $V_1$ 、 $Z$ 、 $k_{12}$ 、および  $k_{21}$  の 5 つのパラメーターによって決定され、動態学的解析によって薬物の血液－乳汁間の薬物の分布特性を評価できる。

## 第四節 繰り返し投与時の乳汁中および血漿中薬物濃度の

### 算出法

授乳婦での単回投与時の体内動態が明らかになることによって、治療上望ましい血中濃度を保つための投与量や投与間隔の設定が可能になる。

薬物の服用を必要とする授乳婦は、90 %以上であり、5 %は慢性的な医薬品の服用を必要とする。<sup>10)</sup> 長期間の繰り返し投与時の乳汁中および血漿中薬物濃度推移をシミュレーションすることは、乳児の薬物曝露を検討する上で必要である。

$j$  回繰り返し投与時の時間  $t$  における血漿中濃度  $C_{1Rt}$  および累積乳汁中排泄量  $X_{mRt}$  は、それぞれ eq. 8 および eq. 9 により得た。

$$C_{1Rt} = \sum_{i=1}^j C_1(t_i) \cdots \text{eq. 8}$$

$$X_{mRt} = \sum_{i=1}^j X_m(t_i) \cdots \text{eq. 9}$$

ただし、 $t_i$  は  $i$  回目投与からの経過時間を示す。



## 第二章 臨床データの収集と解析

### 第一節 臨床データの収集

これまで、わずかではあるものの、臨床的に授乳婦に薬物を投与し、血漿中濃度と乳汁中濃度を測定した研究がある。これらでは、測定値を体内動態解析に用いていない、あるいは解析されていても既存のコンパートメントモデル（分布容積が固定され、乳汁からの薬物排泄がないことを前提としている）が利用されているために、乳児の薬物曝露の計算ができないなどの問題がある。そこで、血漿中濃度および乳汁中濃度の測定値のある論文を検索した。参考文献の詳細、および論文中で示されている  $M/P_{AUC}$  あるいは  $M/P_{conc}$  を Table 2 に示す。

### 第二節 臨床データの解析法と適切なモデルの選択法

モデル解析において、高次なモデルの利用は最小二乗フィッティングの残差を小さくする。そのため、残差のみを指標とした当てはめ計算の結果は、実在しないコンパートメントをモデルに導入して、実験本来の誤差を過小評価することにつながり、さらに実態とは異なるモデルによる解析結果を与えてしまう。そのため、正確な  $M/P_{ss}$  を求めるためには、最適なモデルによって血漿中および乳汁中濃度の実測値を解析しなければならない。そこで、4-po-P および 4-inf-P での解析と同時に、より低次なモデルを構築して解析を行った。その構築については次節に詳細を述べる。

解析には、血漿中濃度および乳汁中濃度の平均値を用い、Microsoft Excel 2003 ソルバー機能により最小二乗フィッティングを行なった。接近アルゴリズムとしては準ニュートン法を用いた。また、eq. 10 から残差平方和 (SS) を算出し、モデルの妥当性を評価するために eq. 11 から赤池の情報量基準 (AIC) も算出した。

Table 2. Clinical data reported for the different drugs

Reference	Drugs	Administration	Dosage	Number of concentration data		Reported M/P ratio
				Plasma	Milk	
A. Somogyi. et al., 1979	Cimetidine	Single oral dose	400 mg	5	5	AUC ratio (1.7)
C.Y. Oo et al., 1995	Alprazolam	Single oral dose	0.5 mg	10	10	AUC ratio (0.36±0.113)
B.W. Willism et al., 1984	Atenolol	Single oral dose	50 mg	4	3	AUC ratio (2.9)
B.D. Obermeyer et al., 1990	Nizatidine	Single oral dose	150 mg	9	6	Concentration ratio (1.6~4.9 at 1h after dose)
D.A. Kafetzis et al., 1981	Amoxicillin	Single oral dose	1 g	3	6	Concentration ratio (0.014, 0.013, and 0.043 at 1, 2, and 3h after dose, respectively)
D.A. Kafetzis et al., 1981	Cephalexin	Single oral dose	1 g	3	6	Concentration ratio (0.008, 0.021, and 0.140 at 1, 2, and 3h after dose, respectively)
D.A. Kafetzis et al., 1981	Cefadroxil	Single oral dose	1 g	3	8	Concentration ratio (0.009, 0.011, and 0.019 at 1, 2, and 3h after dose, respectively)

そして、モデル間で AIC を比較し、AIC が最小のモデルを各薬物の解析に最適なモデルとした。

$$SS(P_1, P_2, P_3, \dots, P_k) = \sum_{i=1}^{i=n} \{y_i - f_i(P_1, P_2, P_3, \dots, P_k, t_i)\}^2 \quad \cdots \text{eq. 10}$$

$y_i$  :  $t_i$  時間における測定値,  $f_i$  :  $t_i$  時間における計算値

$$AIC = n \cdot \ln S + 2r$$

$n$  : 測定点の数,  $S$  : eq. 9 により算出,  $r$  : 最小二乗法で調整した定数の数

$$S(P_1, P_2, P_3, \dots, P_k) = \sum_{i=1}^{i=n} w_i \{y_i - f_i(P_1, P_2, P_3, \dots, P_k, t_i)\}^2 \quad \cdots \text{eq. 11}$$

$w_i$  :  $t_i$  時間における測定値  $y_i$  に対する重み (本検討では  $w_i = 1/y_i$  とした)

### 第三節 低次モデルの構築と利用

妥当性の高いモデルにより解析するためには、4-コンパートメントモデルでの解析と同時に、低次モデルを構築して解析を行い、上述の比較を行わなければならない。そこで、Table 3 に示す低次モデルを構築した。各モデルから得られる M/Pss,  $C_1$  および  $C_m$  を Table 3 に示す。ただし、これらのモデルの利用は、4-po-P あるいは 4-inf-P とは別途にプログラムを用意するのではなく、以下のような一部のパラメータの固定により低次モデルの利用環境を設定できる。

ブレストコンパートメントが、セントラルコンパートメントと隣接するモデル、つまりセントラルコンパートメントから直接ブレストコンパートメントへ薬物が排泄されるモデルへは、速度論パラメータを  $k_{12}^{4-com} = k_{ex}^{\text{低次モデル}}$ ,  $k_{21}^{4-com} = 0$ , および  $k_{ex}^{4-com} > 1000$  とすることによって Peri. 2 (Fig. 2) の関与を消す。これにより、3-inf-C, 3-po-C へと導くことが出来る。もう一方の Peri. 3 (Fig. 2) の関与を消すためには、 $k_{13}^{4-com} < 0.1$ , および  $k_{31}^{4-com} > 10$  を代入する。これにより、3-inf-P および 3-po-P を利用できる。また、両ペリフェラルコンパートメントを含まないモデル (2-inf-C および 2-po-C) へは、上記の二つの条件を満たすことによって誘導が可能である。

Table 3. Constructed pharmacokinetic models for the analysis and theoretical formula for the estimation of M/Pss, and  $C_1$  and  $C_m$

2-inf-C, 2-po-C	3-inf-C, 3-po-C
<p>Inf Model</p> <p>PO Model</p>	<p>Inf Model</p> <p>PO Model</p>
$M/Pss = \frac{k_{ex} V_1}{Z}$	$M/Pss = \frac{k_{ex} V_1}{Z}$
$C_1 = \frac{F k_a X_0}{V_1 (k_a - (k_{el} + k_{ex}))} (e^{-(k_{el} + k_{ex})t} - e^{-k_d t})$	$C_1 = \frac{F k_a X_0}{V_1} \left( \frac{k_{21} - k_a}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)} e^{-k_d t} + \frac{k_{21} - \alpha}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{k_{21} - \beta}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)} e^{-\beta t} \right)$
$C_m = \frac{\frac{F k_a k_{ex} X_0}{k_a - (k_{el} + k_{ex})} \left( \frac{1}{k_a} (e^{-k_d t_2} - e^{-k_d t_1}) - \frac{1}{k_{el} + k_{ex}} (e^{-(k_a + k_{ex}) t_2} - e^{-(k_a + k_{ex}) t_1}) \right)}{Z(t_2 - t_1)}$	$C_m = \frac{F k_a k_{ex} k_{12} X_0}{Z(t_2 - t_1)} \left( \frac{k_{21} - k_a}{k_a (\alpha - k_a)(\beta - k_a)} (e^{-k_d t_1} - e^{-k_d t_2}) + \frac{k_{21} - \alpha}{\alpha (k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} (e^{-\alpha t_1} - e^{-\alpha t_2}) + \frac{k_{21} - \beta}{\beta (k_a - \beta)(\alpha - \beta)} (e^{-\beta t_1} - e^{-\beta t_2}) \right)$

Table 3. Continued

3-inf-P, 3-po-P

4-inf-P, 4-po-P

$$M/PSS = \frac{k_{cx}k_{12}V_1}{(k_{cx} + k_{21})Z}$$

$$M/PSS = \frac{k_{cx}k_{12}V_1}{(k_{cx} + k_{21})Z}$$

$$C_1 = \frac{Fk_aX_0}{V_1} \left( \frac{\frac{k_{cx} + k_{21} - k_a}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)} e^{-k_d t} + \frac{k_{cx} + k_{21} - \alpha}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} e^{-\alpha t}}{1 + \frac{k_{cx} + k_{21} - \beta}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)} e^{-\beta t}} \right)$$

$$C_1 = \frac{Fk_aX_0}{V_1} \left( \frac{\frac{(k_{cx} + k_{21} - k_a)(k_{31} - k_a)}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} e^{-k_d t} + \frac{(k_{cx} + k_{21} - \alpha)(k_{31} - \alpha)}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t}}{1 + \frac{(k_{cx} + k_{21} - \beta)(k_{31} - \beta)}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{(k_{cx} + k_{21} - \gamma)(k_{31} - \gamma)}{(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t}} \right)$$

$$C_m = \frac{Fk_a k_{cx} k_{21} X_0}{Z(t_2 - t_1)} \left( \frac{1}{k_a(\alpha - k_a)(\beta - k_a)} (e^{-k_d t_1} - e^{-k_d t_2}) \right. \\ \left. + \frac{1}{\alpha(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} (e^{-\alpha t_1} - e^{-\alpha t_2}) \right. \\ \left. + \frac{1}{\beta(k_a - \beta)(\alpha - \beta)} (e^{-\beta t_1} - e^{-\beta t_2}) \right)$$

$$C_m = \frac{Fk_a k_{cx} k_{12} X_0}{Z(t_2 - t_1)} \left( \frac{k_{31} - k_a}{k_a(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} (e^{-k_d t_1} - e^{-k_d t_2}) \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} (e^{-\alpha t_1} - e^{-\alpha t_2}) \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \beta}{\beta(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} (e^{-\beta t_1} - e^{-\beta t_2}) \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} (e^{-\gamma t_1} - e^{-\gamma t_2}) \right)$$

### 第三章 乳汁中および血漿中濃度推移のシミュレーション

#### と臨床データの解析

#### 第一節 乳汁中および血漿中濃度推移のシミュレーション

##### による $M/P_{ss}$ の有用性

乳汁が、セントラルコンパートメントから排泄される場合、Fig. 3 のように血漿中濃度と乳汁中濃度はほぼ平行に推移し、乳汁中濃度の上昇は血漿中濃度の上昇から遅れない。一方、Table 4 の条件下、3-po-P でシミュレーションすると、血漿中に比べ乳汁中濃度の上昇は遅れ、平行に推移しない (Fig. 4a)。これより、 $M/P$  は一定の値をとらずに時間依存的に変化することが分かる。この現象は、Wilson らの報告と一致し、<sup>24)</sup>  $M/P$  を薬物固有の定数として扱うためには、何らかの工夫が必要

である。著者は、定速静注したときの定常状態の濃度比を提案する。Gerk らや Alcorn らによる動物実験では、<sup>35, 36)</sup> 定速静注条件下の乳汁中对血漿中濃度比を  $M/P$  として示している。

3-po-P での解析に用いたパラメータ (Table 4) を 3-inf-P によりシミュレーションすると、経口投与時と同様に乳汁中濃度の上昇は血漿に比べて遅れるが、やがて両濃度とも定常状態に到達し、 $M/P_{ss}$  が得られる (Fig. 4b)。経口投与に

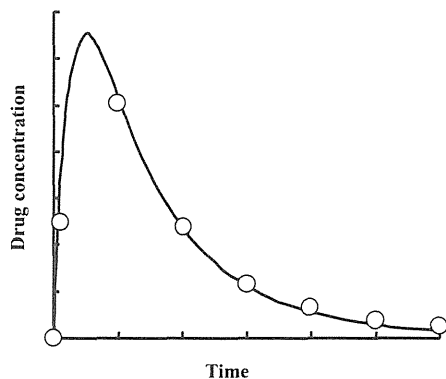


Fig. 3. A case of concentration and time profiles in drug excreted from central compartment into milk. Curve and  $\bigcirc$  indicate plasma and milk concentrations of drug, respectively.

より得られた血漿中および乳汁中濃度の測定値から M/Pss を誘導できることは、薬物動態学上の取り扱いの視点から、極めて便利である。また、分配の概念から導かれた物理化学的予測法による M/P と対比させて考えやすい。

Table 4. Pharmacokinetic parameters for simulation using 3-inf-P and 3-po-P

	$X_0$ (mg)	$K_0$ (mg/h)	$F$	$k_a$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{el}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{12}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{21}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_m$ (h <sup>-1</sup> )	$V_1$ (L)	M/P	$\tau$ (h)
3-po-P	500	-	1	1	0.2	0.02	0.15	0.01	50	1.875	4
3-inf-P	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-

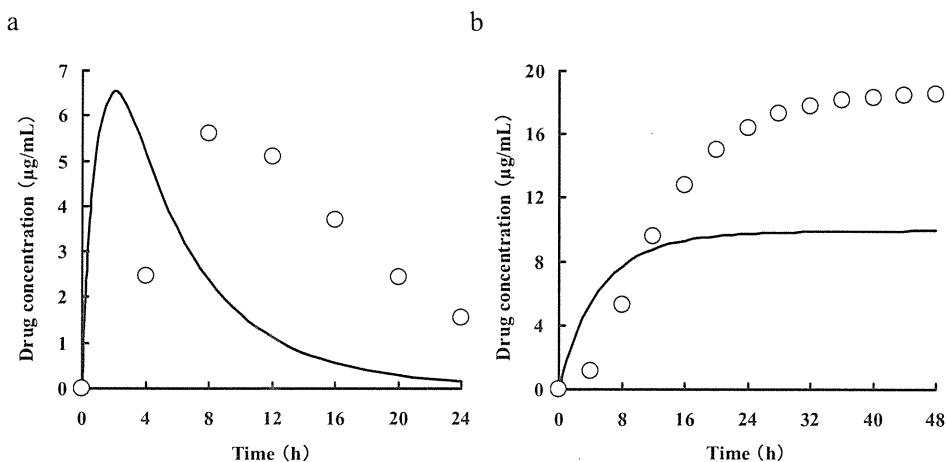


Fig. 4. The time courses of plasma and milk concentrations obtained by simulation using 3-po-P (a) and 3-inf-P (b). Curve and ○ indicate plasma and milk concentrations of drug, respectively. Feeding interval ( $\tau$ ) is 4 hours.

## 第二節 フィッティング分析による薬物の乳汁移行性評価

Table 2 の臨床報告の実測値から、フィッティング解析によって得られたパラメータ値を Table 5 に示す。以下に各薬物の解析について解説する。

Table 5. Pharmacokinetic parameters estimated by model analysis of clinical data

	$F$	$k_a$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{el}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{12}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{21}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{13}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{31}$ (h <sup>-1</sup> )	$k_{ex}$ (h <sup>-1</sup> )	$V_1$ (L)	Model
Cimetidine	1	2	0.35	0.0095	0.81	0.1	1.90	0.070	65	4-po-P
Alprazolam	1	4	0.079	0.00043	0	0.176	0.395	1000	40	3-po-C
Atenolol	1	1.21	0.087	0.195	1.24	0.01	1.39	0.011	60	4-po-P
Nizatidine	1	0.99	0.65	0.00016	0	0.10	5.68	1000	48	3-po-C
Amoxicillin	0.85	0.611	0.59	0.0346	0.208	0.557	1.12	0.0012	20	4-po-P
Cephalexin	0.9	1.40	1.08	0.0002	10 <sup>-10</sup>	0.1	10	0.13	17	3-po-P
Cefadroxil	0.9	0.33	0.186	0.0001	1.54 × 10 <sup>-10</sup>	0.021	1	0.55	19	4-po-P



## 1. Cimetidine<sup>20)</sup>

授乳婦 1 人に cimetidine 400 mg を単回経口投与し，血漿および乳汁中濃度をそれぞれ求めている．臨床データおよび解析結果をプロットしたグラフを Fig. 5 に示す．臨床データから乳汁中濃度の上昇は，血漿中濃度の上昇よりも遅れており，薬物はペリフェラルコンパートメントを介して乳汁中へ排泄されると推測される．フィッティングの結果，AIC は 4-po-P で最も小さく，解析に適したモデルであった．解析結果から得られた薬物動態パラメータ（Table 5）を用いて，eq. 7 で M/Pss を算出すると 1.47 となり，Somogyi らが論文で AUC 比として求めた M/P である 1.7 とほぼ等しかった．

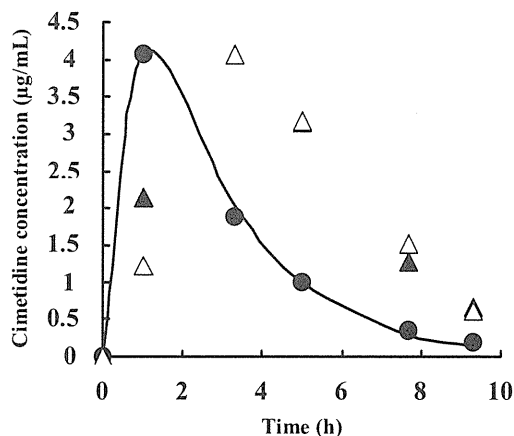


Fig. 5. Pharmacokinetic analysis of clinical data published after a single oral administration of cimetidine. ● and ▲ indicate plasma and milk concentrations of drug in published literature, respectively. Curve and △ represent the fitted curve for ● and the fitted symbol for ▲, respectively. △ overlaps ▲ at 3.3 and 5 hour after the administration of cimetidine.

## 2. Alprazolam<sup>37)</sup>

授乳婦 8 人に alprazolam 0.5 mg を単回経口投与後の血漿中と乳汁中の薬物濃

度推移は平行であり (Fig. 6), そのため, 薬物はセントラルコンパートメントからブレストコンパートメントへ直接排泄されていると考えられ, 解析の結果からも適したモデルは 3-po-C とペリフェラルコンパートメント (Peri. 2) を介さないモデルだった. 算出されたパラメータより,  $M/P_{ss}$  は 0.52 であり, Oo らの AUC 比として求めた  $M/P$  ( $M/P_{AUC}$ ;  $0.36 \pm 0.113$ ) とは大きく異なるものではなかった.

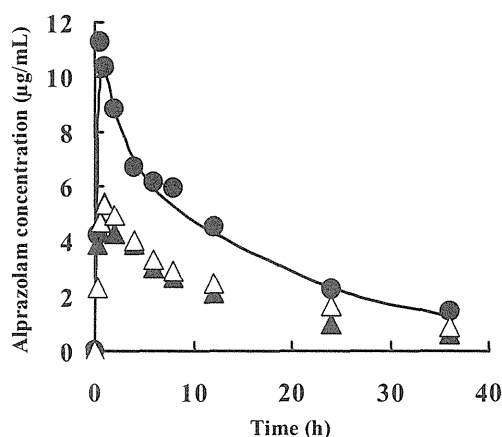


Fig. 6. Pharmacokinetic analysis of clinical data published after a single oral administration of alprazolam. ● and ▲ indicate plasma and milk concentrations of drug in published literature, respectively. Curve and △ represent the fitted curve for ● and the fitted symbol for ▲, respectively. △ overlaps ▲ at 0.5 and 1 hour after the administration of alprazolam.

### 3. Atenolol<sup>22)</sup>

授乳婦 1 人に atenolol 50 mg を単回経口投与している. 乳汁中濃度の上昇は血漿中濃度の上昇よりも遅れているため (Fig. 7), 薬物はペリフェラルコンパートメントを介して乳汁中へ排泄され则认为られた. Cimetidine と同様に適した解析モデルは 4-po-P だった.  $M/P_{ss}$  は 3.21 であり, William らの報告した  $M/P_{AUC}$  (2.9) とほぼ等しかった.

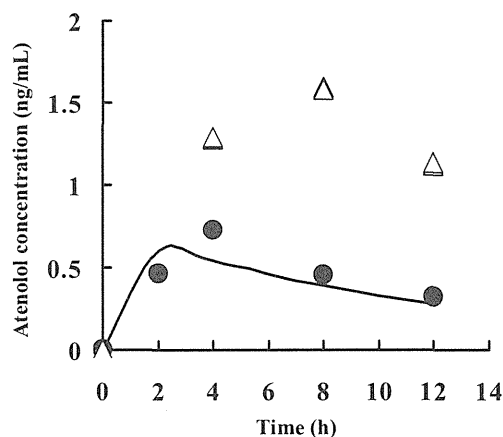


Fig. 7. Pharmacokinetic analysis of clinical data published after a single oral administration of atenolol. ● and ▲ indicate plasma and milk concentrations of drug in published literature, respectively. Curve and △ represent the fitted curve for ● and the fitted symbol for ▲, respectively. △ overlaps ▲ at 4, 8, and 12 hour after the administration of atenolol.

#### 4. Nizatidine<sup>38)</sup>

授乳婦 3 人に nizatidine 150 mg を単回経口投与している。この論文での M/P はある時間での乳汁中对血漿中濃度の比として示されている。投与後 1 時間付近での乳汁中濃度と血漿中濃度の比には個人差があり、1.6 から 4.9 の幅があった。この血漿中濃度および乳汁中濃度の推移に時間的ずれはないため (Fig. 8), セントラルコンパートメントからの乳汁中への薬物排泄と考えられる。実測値と計算値の残差平方和が最も小さく、AIC が最も小さかった 3-po-C でのシミュレーション結果より、M/Pss は 2.24 だった。

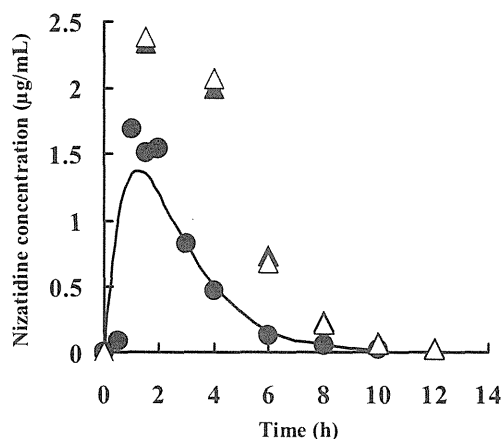


Fig. 8. Pharmacokinetic analysis of clinical data published after a single oral administration of nizatidine. ● and ▲ indicate plasma and milk concentrations of drug in published literature, respectively. Curve and △ represent the fitted curve for ● and the fitted symbol for ▲, respectively. △ overlaps ▲ at 8, 10 and 12 hour after the administration of nizatidine.

## 5. Amoxicillin, cephalexin, cefadroxil <sup>39)</sup>

Amoxicillin, cephalexin, および cefadroxil をそれぞれ 6 人の授乳婦で試験している. いずれの薬物についてもこの論文では M/P はある時間での乳汁中対血漿中濃度比として示されている.

Amoxicillin では, 1 g を単回経口投与後 1, 2, および 3 時間目の濃度比 (乳汁÷血漿) は,  $0.014 \pm 0.004$ ,  $0.013 \pm 0.005$ , および  $0.043 \pm 0.023$  だった. この血漿中濃度と乳汁中濃度の推移は時間的なずれが生じていたため, 乳汁はペリフェラルコンパートメントからの排泄と考えられた (Fig. 9a). AIC より 4-po-P により解析した. <sup>24)</sup> M/Pss は 0.12 であり, 解析により得られたパラメータからシミュレーションすると経口投与後 1, 2, および 3 時間目の濃度比は, 0.006, 0.024, および 0.048 となり, 実測値とほぼ一致した.

cephalexin (Fig. 9b), あるいは cefadroxil (Fig. 9c) を 1 g 投与後の 1, 2, およ

び3時間目の実測濃度比は, cephalexin では  $0.008, 0.021 \pm 0.019$ , および  $0.140 \pm 0.11$ , また cefadroxil では  $0.009, 0.011 \pm 0.004$ , および  $0.019 \pm 0.01$  だった. Cephalexin および cefadroxil の両薬物において, 血漿中および乳汁中濃度の推移に時間的ずれが生じているため (Fig. 9b, 9c), 乳汁はペリフェラルコンパートメントから排泄されると考えられた. Cephalexin では AIC が最も小さかった 3-po-P を用いて解析した結果,  $M/P_{ss}$  は 0.10 であり, シミュレーションすると投与後 1, 2, および 3 時間目の濃度比は, 0.004, 0.027, および 0.089 だった. また cefadroxil では 4-po-P を用いて解析し,  $M/P_{ss}$  は 0.059 であり, シミュレーションによる投与後 1, 2, および 3 時間目の濃度比は, 0.005, 0.018, および 0.030 だった.

これらの結果をまとめると, alprazolam, atenolol, および cimetidine の  $M/P_{ss}$  は, 論文中で報告されている  $M/P_{AUC}$  にほぼ一致した. また, amoxicillin, cefadroxil, cephalexin, および nizatidine に関する  $M/P$  は  $M/P_{conc}$  としてしか報告されておらず, あらためて, 妥当な  $M/P$  である  $M/P_{ss}$  が得られ, シミュレーション解析より, 各サンプリングポイントでの  $M/P_{conc}$  を算出し, 実測値と比較したところ, 良好な一致が認められた. 授乳婦に対して臨床的使用頻度の高いこれら抗生物質 (amoxicillin, cefadroxil, cephalexin) の  $M/P$  が小さいことから, これらは乳汁中へ移行しにくく, また atenolol および nizatidine が, 比較的乳汁中へと移行しやすいことを明らかにできた.

本編のモデルによって臨床的に需要の高い情報である  $M/P$  が得られ, また, 解析により, 速度論パラメータの算出が可能になり, これら薬物については, 次章で述べる授乳計画の設計が可能となった.

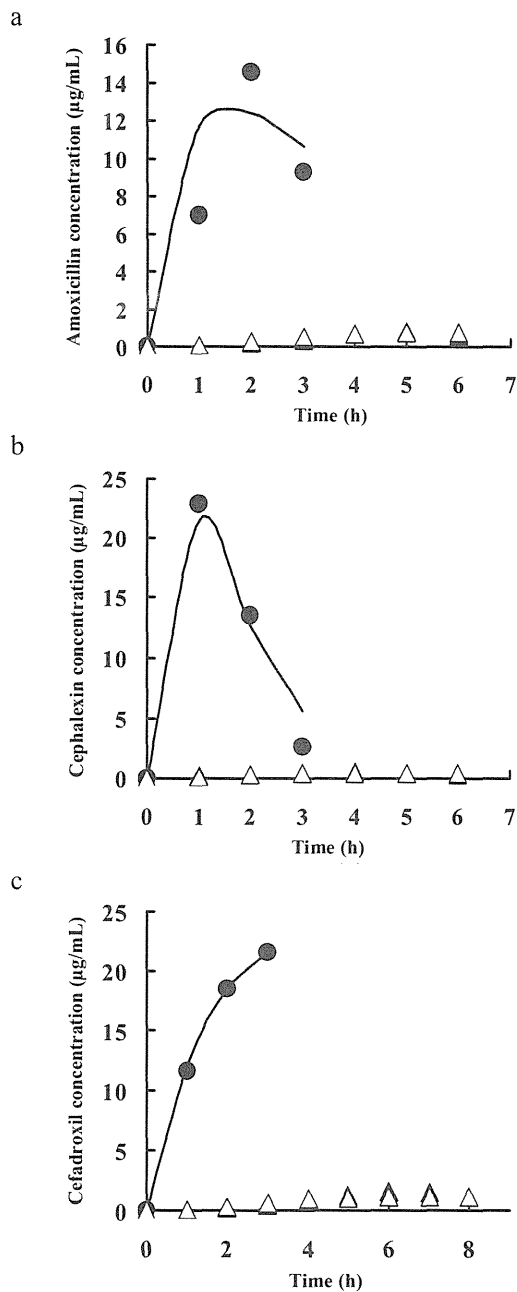


Fig. 9. Pharmacokinetic analysis of clinical data published after a single oral administration of amoxicillin (a), cephalixin (b), and cefadroxil (c). ● and ▲ indicate plasma and milk concentrations of drug in published literature, respectively. Curve and △ represent the fitted curve for ● and the fitted symbol for ▲, respectively. △ overlaps ▲ after the administration of amoxicillin, cephalixin, and cefadroxil, respectively.

## 第四章 乳児の薬物曝露を最小化するための服用方法およ

### び授乳スケジュールのシミュレーション解析

#### －Cimetidine 服用患者の例－

著者の M/P 算出は、単に M/P を求めるだけではなく、体内動態パラメータを求めた上での M/P 算出である。そのため、これらのパラメータを用いて、経時的な血漿中および乳汁中濃度がシミュレーションできる。例として、Table 5 の cimetidine のパラメータを用いて乳児の薬物曝露量をシミュレーションし、曝露が最小になる方法を考案した (Fig. 10a, b)。母親が 800 mg 分 4 (毎食後および就寝前) で cimetidine を服用し、4 時間間隔で授乳した場合が Fig. 10a である。一方、800 mg を分 1 で服用し、3 時間間隔で授乳することを仮定した場合が Fig. 10b である。このいずれの投与法も本邦の保険制度上認められている。なお、シミュレーションは、乳汁の 1 日産生量を 800 mL、乳児の 1 回の哺乳量を 100 mL として行なった。Table 6 には、乳汁中の cimetidine 濃度を示した。Fig. 10a 中の実線の矢印に従って乳汁を飲んだ場合、乳児の薬物摂取量は 1 日あたり 0.98 mg であった。Fig. 10b 中の破線の矢印は乳汁中薬物濃度が高いために、搾乳して乳児に与えないものであり、他の 6 回は蓄乳してから授乳あるいは直接授乳するものとする。蓄乳した母乳を冷凍保存し、解凍して乳児に与えることは、職業を持つ授乳婦では一般に行われている。これにより乳児の薬物摂取量は 0.26 mg と計算され、6 時間ごとに授乳するときの約 1/4 に減らすことができる。

このように速度論モデルを用いることにより、乳汁中および血漿中濃度のデータから体内動態パラメータを算出でき、安全な授乳が可能であるかを、投与スケジュールあるいは授乳スケジュールをシミュレーションすることによって検討することができる。

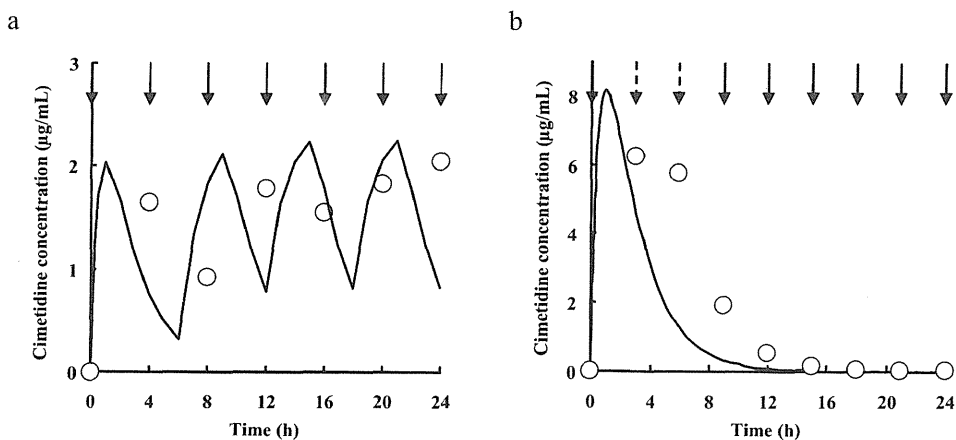


Fig. 10. Simulations of time-courses of plasma and milk concentrations under the different conditions. Curve and ○ indicate plasma and milk concentration of cimetidine, respectively. Arrow and dotted arrow indicate lactation time and the time when avoids lactation, respectively. (a) ; Cimetidine 200 mg four times a day and the feeding interval is 4 hours, (b); cimetidine 800 mg once a day and the feeding interval is 3 hours.

Table 5. Cimetidine concentration in milk calculated by simulation

Cimetidine 200 mg four times a day and feeding interval is 4 hours		Cimetidine 800 mg once a day and feeding interval is 3 hours	
Lactation time (h)	Milk concentration (µg/mL)	Lactation time (h)	Milk concentration (µg/mL)
4	1.64	3	6.24
8	0.92	6	5.75
12	1.78	9	1.92
16	1.55	12	0.51
20	1.82	15	0.12
24	2.05	18	0.03
		21	0.01
		24	0.00



## 第五章 小括および考察

乳汁中薬物濃度に関する情報が少ないため、乳児の薬物曝露を懸念して、必要な授乳の回避や薬物治療の中断が行われている可能性がある。このような背景の下、授乳婦での臨床試験の必要性が高まっており、FDA は臨床試験に関するドラフトガイダンスを発表した。これまで、臨床研究において十分な解析が行なわれていないことから、FDA は、コンパートメントモデルによる臨床データの解析方法の提案を期待している。

Wilson らは、<sup>24)</sup> 薬物の乳汁中への移行を評価するために 4-コンパートメントモデルの必要性を訴えたものの、解法には至らなかった。そのモデルはセントラル、ペリフェラル、乳腺組織、およびミルクコンパートメントからなり、ミルクコンパートメントから体外へ排泄される。

著者らが構築したモデルが、Wilson らと異なる点として、ブレストコンパートメント (Wilson らのミルクコンパートメントに相当) の取り扱い方があげられる。Wilson らは、ミルクコンパートメントと乳腺組織コンパートメントを相方向の矢印 (平衡関係) で結び、各コンパートメントの分布容積を定数とした一般的なモデルを提案している。<sup>24)</sup> しかし、実際には乳汁の産生と授乳によって乳汁の分布容積は逐次変化するため、乳汁中濃度の算出は困難であり、著者はブレストコンパートメントを乳汁および薬物の一次貯蔵コンパートメントとすることによってその問題を解決した。乳汁中への薬物累積排泄量と時間の関係式から、ある間隔での排泄量をその時間内に産生された乳汁量で割ることによって乳汁中薬物濃度を算出することが可能になった (eq. 4)。さらに、血漿中濃度および乳汁中濃度の時間推移を求める式から薬物動態パラメータの関数として M/Pss 算出法 (eq. 7) を提案した。構築したモデルを用いて各々の薬物の血漿中および乳汁中濃度を同時フィッティングし、得られた動態パラメータから M/P を算出できる。著者は個々の薬物に対して最適なモデルによる解析から M/Pss を求めた。Table 5 の cimetidine, atenolol および alprazolam について報告された M/P<sub>AUC</sub> 比は、乳汁中薬物濃度と血漿中薬物濃度の実測値からそれぞれの濃度対時間曲線下面積を求め、その比をとったものであり、解析の結果から

それらの値はほぼ一致した (Fig. 5, 6, 7). Amoxicilline, cephalixin, および cefadroxil は  $M/P_{AUC}$  比が報告されておらず, 3 つの時点における濃度比として示されていたため,  $M/P$  を求めるとともに, 報告された濃度比を, 得られたパラメータを用いて計算し, ほぼ一致を見た (Fig. 9a, 9b, 9c).

本方法は,  $M/P$  を  $M/P_{ss}$  とすることで, 臨床データから算出することを可能とした有用な方法であると考えられる. また, 算出された体内動態パラメータから薬物動態学的な推計・設計・考察ができるために有用性が高い. これまで算出されてきた  $M/P_{AUC}$  は, 台形法で求められているものが多く, 速度論パラメータは求められていなかった. また, 速度論パラメータが算出されていたとしても, 先に述べたように妥当なモデルで解析されていないため, 正確なパラメータの算出は行なわれていない. そのため, 繰り返し投与時のような長期的に薬物を服用した場合の血中および乳汁中濃度を検討することは不可能であった. しかし, 本法では, cimetidine の例に示すように, 血中および乳汁中濃度推移を求めることはもちろんのこと, さらに授乳スケジュールや用法用量を変更した場合の乳児の薬物曝露を評価できる.

本編で構築したモデルは, 臨床研究で得られる血中および乳汁中濃度から, 授乳婦での薬物動態学的パラメータを算出すること, 乳児の薬物曝露を見積もること, および授乳を介した薬物曝露を最小化するための用法用量および授乳スケジュールを検討することにふさわしいものであり, 臨床的に利用されることを期待する.

## 第二編 ヒト乳腺上皮細胞を用いた in vitro 乳汁移行性評価モデルの構築

第一編では、ヒトでの臨床データを解析できる動態学的モデルを構築し、モデル解析による M/Pss の算出だけでなく、乳児の薬物曝露を最小化するための用法用量や授乳スケジュールの策定を行なえることを明らかにした。しかし、モデル解析は臨床データの存在する薬物に対してのみに有用な方法であり、臨床データが得られてない薬物の乳汁移行性を評価できる方法が必要である。

これまでに、薬物の乳汁中への移行が受動拡散に支配されていると仮定した in vitro 予測法が報告されている。その方法は、pH 分配仮説、乳脂質相への分配およびタンパク結合率を含む薬物の物理化学的性質に基づいている。具体的には平衡透析法、<sup>19, 40, 41)</sup> 拡散法、<sup>42-46)</sup> 予測回帰モデル<sup>23, 47, 48)</sup> などが報告されてきた。特に予測回帰モデルに分類される Atkinson らの方法は、pKa、血漿中タンパク非結合率、および pH7.2 での n-オクタノール/水分配係数の 3 つのパラメータのみから M/P 予測が可能であり、他の方法に比べて予測が容易であることから、広く知れている。しかし、cimetidine や nitrofurantoin の乳汁中への移行には能動輸送系の関与が示唆されており、<sup>21, 26)</sup> 乳汁移行を単純な受動拡散のみでとらえることは困難であると考えられる。そのため、既存の予測法の臨床的価値は低い。

血液－乳汁間において、乳腺上皮細胞はバリアーとして働き、物質移行を制限しており、さらにヒトおよびラットの授乳期乳腺上皮細胞でトランスポーターの発現が観察されたため、<sup>25, 36)</sup> 能動輸送を含めた物質輸送を評価するためには、乳腺上皮細胞を用いたモデルは有用であると考えられる。

乳腺は、乳汁の産生および分泌を行なう哺乳類特有の器官である。乳腺の實質をなす乳腺上皮細胞は脂肪組織中に埋まっており、この中で樹枝状形態をとって発育する。Estrogen, progesterone, prolactin などのホルモンの働きによって妊娠期には、乳腺上皮細胞の急激な増殖がみられ、また、出産直後には分化し、乳汁産生が開始され、大量の乳汁タンパク質が合成されるようになる。<sup>49)</sup> そ

のため、授乳期間中の現象を捉えるためには、授乳期と同様の機能を有する培養細胞系を構築しなければならない。また、経細胞輸送を評価するために in vivo と同等のバリアー機能を有し、さらに輸送担体を介した乳汁移行を再現できなければならない。

Schmidhauser らは、<sup>50)</sup> prolactin に応答して $\beta$ -casein を発現することが明らかなマウス乳腺上皮細胞株である COMMA-1D 細胞<sup>51)</sup> から機能分化した細胞グループを選択的に回収することに成功し、さらに Toddywalla ら<sup>52)</sup> や Gerk ら<sup>53)</sup> は、その細胞を用いてタイトな単層膜を形成し、乳汁中へ移行しやすいことが報告されている nitrofurantoin の能動輸送について検討してきた。しかし、授乳期における薬物の乳汁移行性には種差が観察されることから、<sup>54)</sup> ヒトでの乳汁移行性を評価するためにヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) を用いた培養細胞系の構築が望まれる。

これまでに、HMEC を用いて、経細胞輸送を評価できる授乳期機能を有した単層膜を培養した報告はない。本編では、ヒトでの授乳期における乳腺上皮細胞を介した能動輸送を再現できる培養細胞による評価系を構築し、その単層膜の乳汁移行性評価系としての有用性を評価することを目的として以下の検討を行なった。

# 第一章 Trypsin 処理を応用したヒト乳腺上皮細胞培養法

## に関する検討

これまでに機能分化した HMEC 単層膜に関する報告はなく、マウスやラットの乳腺上皮細胞 (MEC) を用いた研究では、単層培養系で機能分化させることは困難であると報告されてきた。<sup>55)</sup> しかし、Schmidhauser らは、COMMA-1D 細胞を用いた単層培養系において、細胞を trypsin 処理することにより授乳期乳腺と同等の分化状態に導くことに成功した。<sup>50)</sup> 彼らは、ディッシュ上で COMMA-1D 細胞を単層培養し、trypsin 処理時間を 4 段階に分け、それぞれの処理で剥がれてきた細胞を別のディッシュ上で培養した。その結果、もっとも長時間の処理により剥がれてきた細胞、つまり trypsin に対して最も強い抵抗性を示した細胞のうち 37% が  $\beta$ -casein 産生細胞 (CID9 細胞) であったと報告した。このことは、trypsin 抵抗性をもつ細胞で  $\beta$ -casein を産生する授乳期特異的な機能が発現していることを示している。さらに、Toddywalla らは、フィルター上で CID9 細胞の単層膜を形成し、経上皮抵抗値 (TER) の高いグループを選択することによってタイトな上皮細胞単層膜の形成に成功した。<sup>52)</sup> その細胞を介した薬物輸送実験では、nitrofurantoin は乳汁方向へ能動輸送され、<sup>52)</sup> その輸送にナトリウム依存性トランスポーターが関与していることが明らかとなり、<sup>53)</sup> trypsin 処理培養系は受動拡散および能動輸送の両方を評価できる授乳期細胞培養モデルとなると考えられた。

著者らは、その trypsin を用いた方法を HMEC に応用した。その培養法を Fig. 11 に示す。オリジナルの HMEC をディッシュに播種し、ヒト乳腺上皮細胞培

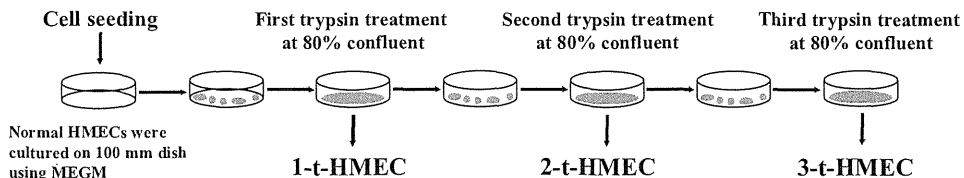


Fig. 11. Culture method for t-HMECs

養専用培地 (MEGM) を用いて培養した。80 % confluent の状態で trypsin 処理し、剥離した HMEC は cell culture insert 上で培養し、剥離しなかった HMEC は継続してディッシュ上で培養した。Fig. 11 に示すように trypsin 処理と培養を繰り返すことにより、各回数の trypsin 処理に抵抗性を示した HMEC (t-HMEC) を分取し、ディッシュおよび cell culture insert 上で培養した。細胞は、trypsin 処理回数に基づいて 1-t、2-t、および 3-t-HMEC と名づけた。

本章では、授乳期乳腺機能を有する細胞を培養するために、まず HMEC に対する trypsin 処理の効果について検討し、次に t-HMEC 培養細胞系の乳汁移行性評価系としての有用性について薬物を用いて検討した。

## 第一節 ヒト乳腺上皮細胞単層膜の形態学的特徴

Estrogen, progesterone, prolactin などのホルモンの働きによって、妊娠期には乳腺上皮細胞の急激な増殖がみられる。このときの上皮細胞は立方または円柱状の形態をとり、単層構造を形成して腺腔を取り囲んでいる。<sup>56)</sup> 一般に、上皮細胞は透過性メンブレン上に播種されると、細胞は培養容器表面に接着して、伸展し、上皮細胞の特徴として敷石状の単層膜を形成する。そして、バリアー機能を発達させ、輸送、拡散、分泌、および薬剤取り込みの研究を可能とする。

著者は、乳腺上皮細胞を介した輸送を評価できる単層膜を形成する t-HMEC を選択するために、それぞれの t-HMEC をディッシュ上に播種し、培養期間中の細胞の形態変化を観察した。

それぞれの単層膜の形態学的特徴を Fig. 12 に示す。顕微鏡写真は、1-t、2-t、3-t-HMEC でそれぞれ培養 7、10、および 14 日目に撮影した (Fig. 12a, b, c)。これら細胞は、すべて敷石状の単層膜を形成し、上皮細胞様の形態学的特性を維持していた。しかし、4 回の trypsin 処理を受けた細胞では、播種翌日から細胞同士が凝集してしまい、培養 3 日目には凝集体のまま増殖し (Fig. 12d)、培養を継続しても単層膜を形成しなかった。

このことから trypsin 処理には最適な回数があり、以降の検討では 3 回までの

trypsin 処理を受けた細胞（1-t, 2-t, および 3-t-HMEC）を用いて単層膜の授乳期乳腺機能の発現を評価した.

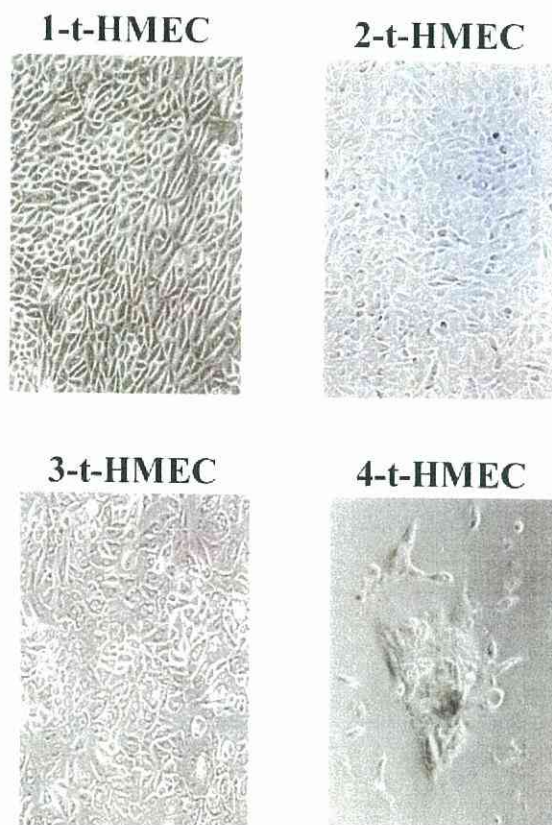


Fig. 12. Microscopic image of t-HMEC monolayers (100x magnification).

## 第二節 経上皮抵抗値に対する trypsin 処理の影響

乳腺上皮細胞は、非授乳期より授乳期で非常にタイトな細胞層を形成し、授乳期間中の主要な物質透過ルートは経細胞輸送である。<sup>57)</sup> そのため、授乳期機能を有する培養細胞系を構築するためには、タイトな単層膜の形成が必要であ

る. Toddywalla らは, <sup>52)</sup> trypsin 抵抗性を有する CID9 細胞由来のタイトな単層膜の形成を成功させた.

著者は, HMEC を trypsin 処理することによって, CID9 細胞と同様にタイトな単層膜を培養できるかを検討するために, 培養中, TER を測定した.

Fig. 13a に各々の t-HMEC での TER のタイムコースを示す. 培養 0 日目は cell culture insert に播種した日を示し, trypsin 抵抗性のより強い細胞で TER の上昇の開始および最大値に到達するまでの培養期間が延長した. また, TER の最大値は, 1-t-, 2-t-, および 3-t-HMEC でそれぞれ培養 11, 14, および 19 日目に得られた.

Fig. 13b には, 最大 TER に対する trypsin 処理の影響について示す. 最大 TER は, trypsin 処理回数の増加に伴って有意に増加し, 3-t-HMEC で  $227 \pm 11 \Omega \cdot \text{cm}^2$  と最も高い値が得られ, 輸送研究を行なうために 3-t-HMEC がもっとも有用であると考えられた.

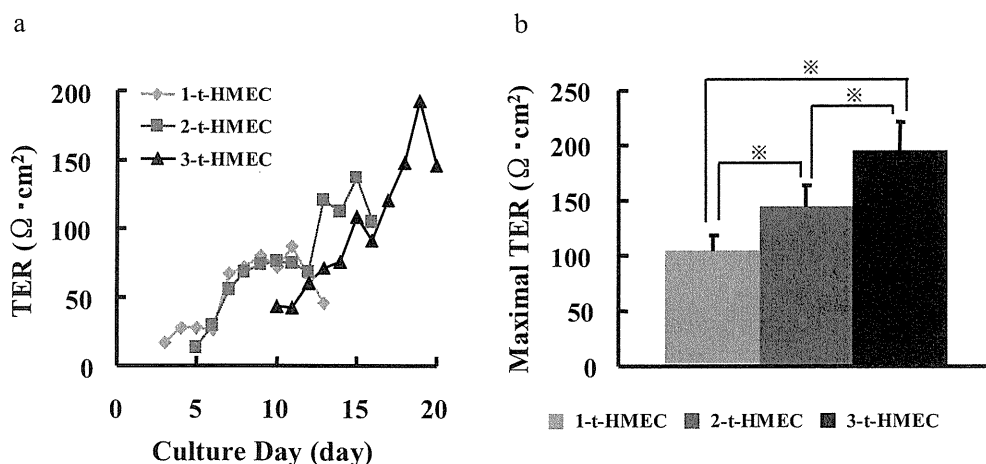


Fig. 13. Effect of trypsin treatment on time course of TER (a) and maximal TER (b)

Each value represents means  $\pm$  S.D. (n=8-10)

\* $p < 0.05$  (ANOVA, Turkey test)



### 第三節 $\beta$ -casein の発現に対する trypsin 処理の影響

ヒトの乳汁には、タンパク質や脂質が多く含まれており、授乳期間中に発達した HMEC では、 $\alpha$ -lactalbumin および乳脂質の産生の増加や casein の特異的な産生が観察される。<sup>59)</sup> 授乳期の HMEC が特異的に産生する casein には、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、および  $\gamma$ -casein があり、そのうち  $\beta$ -casein が授乳期乳腺機能、すなわち機能分化の指標として認められてきた。<sup>55)</sup> そこで、HMEC 培養系が機能分化した実験系であるかどうかを明らかにするために、 $\beta$ -casein の産生について RT-PCR 法および Western blot 法により検討した。

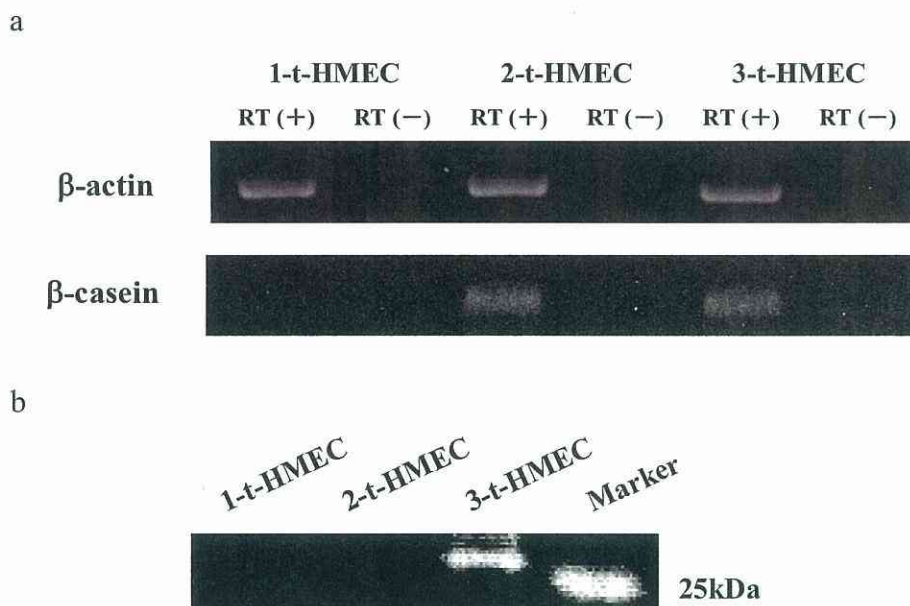


Fig. 14. Effect of trypsinization on  $\beta$ -casein expression in t-HMEC monolayers. (a) Expression of  $\beta$ -casein mRNA was determined in 1-t-HMEC, 2-t-HMEC and 3-t-HMEC. RT-PCR analysis was performed with the specific primer sets. Reactions were performed against total RNA with (+) or without (-) reverse transcription (RT). (b) Expression of  $\beta$ -casein (26kDa) was determined in 3-t-HMEC. Western blot analysis was performed with specific antibody.

Fig. 14a に示すように、2-t および 3-t-HMEC で  $\beta$ -casein mRNA は発現していたが、1-t-HMEC では観察されなかった。このことは、繰り返しの trypsin 処理によって mRNA レベルでの発現が誘導されたことを示唆し、trypsin 処理により強い抵抗性を示す細胞グループにおいて casein 産生細胞が多いという Schmidhauser らの報告に一致する。<sup>50)</sup>

さらに、Western blot 法によってタンパクレベルでの発現を検討した (Fig. 14b) その発現は、3-t-HMEC のみで観察されたが、2-t-HMEC では mRNA が観察されたにもかかわらずタンパク発現が観察されないため、trypsin 処理は転写過程のみならず翻訳過程にも影響を及ぼしている可能性がある。

上記の検討より、3-t-HMEC において機能分化の指標である  $\beta$ -casein の発現が mRNA およびタンパクレベルの両方で確認されたので、この細胞は授乳期と同様の機能を有していることが示唆される。

#### 第四節 単層膜を介したモデル薬物の輸送方向性の検討

3-t-HMEC は、最も高い TER を示し、機能分化していることから、授乳期乳腺細胞の特徴を反映していると考えられた。そこで、能動輸送系の基質を用いて t-HMEC を介した輸送特性を評価し、能動輸送の介在の可能性を検討した。

これまでにいくつかの薬物において、乳腺上皮細胞を介した能動輸送が示唆されている。ヒト臨床試験では、nitrofurantoin,<sup>36)</sup> cimetidine,<sup>21)</sup> および acyclovir<sup>59)</sup> が basal 側 (血液側, B 側) から apical 側 (乳汁側, A 側) へ能動的に輸送されることが示唆され、乳汁中へ蓄積しやすいと報告されている。医薬品の多くは弱電解質であり、生理的環境下ではカチオンあるいはアニオンとして存在するため、organic cation transporters (OCTs) あるいは organic anion transporters (OATs) の基質になる可能性がある。そこで、hOCTs および hOATs の基質を用い、それらの存在の可能性を調べた。モデル基質には、OCTs の基質として <sup>14</sup>C-tetraethylammonium bromide (TEA), OATs の基質として <sup>14</sup>C-*p*-aminohippuric acid (PAH) を用いた。

Table 6. Permeability of model substances and mannitol across t-HMEC monolayers

		P <sub>app</sub> ratio		P <sub>app</sub> mannitol (×10 <sup>-6</sup> cm/s)	
		Apical to Basal	Basal to Apical	Apical to Basal	Basal to Apical
TEA	1-t-HMEC	1.139±0.083	1.227±0.042	5.734±1.382	5.980±1.111
	2-t-HMEC	1.112±0.156	1.230±0.073	2.299±0.270	2.193±0.080
	3-t-HMEC	0.940±0.287	1.356±0.076*	1.395±0.256	1.622±0.230
PAH	1-t-HMEC	0.860±0.106	0.860±0.028	7.387±0.560	7.304±0.500
	2-t-HMEC	0.864±0.100	0.738±0.045	3.693±0.280	3.652±0.250
	3-t-HMEC	0.865±0.106	0.860±0.028	2.629±0.419	2.442±0.119

Each value represents means ± S.D. (n=4-5).

\* $p < 0.05$ , compared with the value in apical to basal direction.

3-t-HMEC を介した TEA の輸送では、B 側から A 側方向への輸送が A 側から B 側方向より有意に高く ( $p < 0.05\%$ , Table 6), 1-t および 2-t-HMEC では、3-t-HMEC と同様の方向性は観察されたが、両方向の間に有意差は観察されなかった (Table 6). このことから、3-t-HMEC では、TEA の A 側方向への移行に輸送担体が関与していると示唆され、乳汁方向へ輸送するトランスポーターの発現パターンとして、細胞内から乳汁方向への排出に関わるトランスポーターの apical membrane での発現、および/あるいは血液側から細胞内への取り込みに関わるトランスポーターの basal membrane での発現が推察される。

PAH ではすべての t-HMEC において輸送方向性は観察されなかった (Table 6). PAH を基質とする OATs に分類されるトランスポーターは、OAT1, OAT2, OAT3, OAT4, および multidrug resistant associated protein 2 (MRP2) であり、OAT1, OAT2, OAT3, および OAT4 はヒト授乳期乳腺上皮細胞に発現しておらず、MRP2 は mRNA レベルでの発現が明らかとなっている。<sup>25)</sup> これらのことから、乳腺上皮細胞での MRP2 を介した PAH 輸送は、方向性を生み出すほどの重要な働きはしていないと考えられる。しかし、今回の実験のみでは、他の OATs の存在の可能性を否定できるものではなく、トランスポーターに対する親和性の異なる数種の基質を用いて、さらなる検討を加える必要があると考えられた。

## 第五節 単層膜での vectorial transport に関与するトランス

### ポーターの発現

3-t-HMEC を介した TEA の輸送では、B 側から A 側への透過が A 側から B 側方向へのそれよりも有意に高く ( $P<0.05$ )、3-t-HMEC を介した TEA 輸送において能動輸送系の関与が示唆された。

Alcorn らは、授乳期および非授乳期 HMEC でのトランスポーターの発現をリアルタイム RT-PCR 法により検討し、授乳期および非授乳期 HMEC での human organic cation transporter 1 (hOCT1) mRNA および human organic cation transporter 3 (hOCT3) mRNA の発現を明らかにした。<sup>25)</sup> hOCT1 は、TEA を基質とするトランスポーターであることが明らかである一方で、hOCT3 は、一部の研究者により TEA を基質とすると報告されている。<sup>61)</sup> さらに、hOCT1 は肝臓や腎臓で発見され、basal membrane に局在し、<sup>62)</sup> その機能は細胞内へ有機カチオンを取り込むプロトンとの交換輸送系である。<sup>63)</sup> また hOCT3 は、ヒトではその局在は明らかになっていないが、胎盤、肝臓および腸管などを含む広範囲の組織に発現しており、<sup>64)</sup> マウスでは血液中から胎盤への取り込みトランスポーターとして報告されていることから、<sup>65)</sup> basal membrane での発現が推察され、これらトランスポーターによる basal membrane を介した TEA 取り込みが輸送方向性に寄与しているかもしれない。

これらのことから、hOCT1 および hOCT3 が 3-t-HMEC を介した TEA の輸送方向性に関与していると考えられ、t-HMEC での hOCT1 および hOCT3 の発現を RT-PCR 法により検討した。

検討したすべての t-HMEC で hOCT1 および hOCT3 mRNA の両者の発現が確認され (Fig. 15)、これら二つのトランスポーターが、3-t-HMEC を介した TEA 輸送の一部に関与していると考えられた。また、本研究では検討していないが、organic cation/carnitine transporter 1 (OCTN1)、および OCTN2 が、TEA を基質として認識し、さらに授乳期乳腺で発現が確認されているので、乳腺での TEA 輸送にそれらトランスポーターが関与している可能性がある。

さらに本研究での RT-PCR 条件下では, hOCT1 mRNA は trypsin 処理回数の増加に伴って発現も増大し, hOCT3 mRNA は, trypsin 処理回数の増加により発現が減少する傾向にあった (Fig. 15). Alcorn らは, 授乳期 HMEC での hOCT1 mRNA および hOCT3 mRNA の発現レベルは, 非授乳期に比べてそれぞれ増加 (7.8 倍) および減少 (0.3 倍) すると報告しており, <sup>25)</sup> この知見と本研究での trypsin 処理の繰り返しによる発現の変化は一致している. このことから, HMEC の trypsin 処理は, 未分化状態から, より分化した授乳期 HMEC を選択するための重要なツールとなっていることがうかがえ, 3-t-HMEC は授乳期乳腺機能を有する単層膜であり, 薬物の経細胞輸送を評価するための有用なツールになり得るかもしれない.

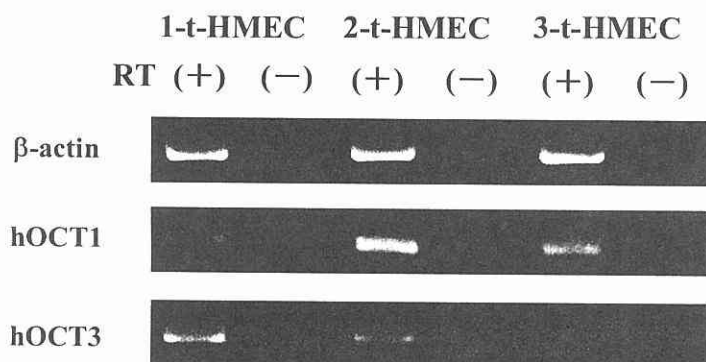


Fig. 15. Expression of trypsin treatment on the transporters related to vectorial transport. RT-PCR analysis was performed with the specific primer sets for the detection of hOCT1 mRNA and hOCT3 mRNA in t-HMEC. Reactions were performed against total RNA with (+) or without (-) reverse transcription (RT).

## 第二章 培養ヒト乳腺上皮細胞の乳汁移行性評価モデルと

### しての有用性評価 ー薬物の乳腺上皮細胞を介し

### た輸送における担体の関与と pH 依存性に関する

#### 検討一

前章では、HMEC を 3 回 trypsin 処理することによって、授乳期機能を有し、能動輸送系を発現した単層膜の形成に成功した。そして、この培養細胞系が、薬物の血液ー乳汁間の移行過程における輸送担体の関与や乳汁移行性を評価するためのツールとなることが期待される。

これまでに薬物の乳汁中への移行が受動拡散に支配されていると仮定した *in vitro* 予測法が報告されてきたが、乳汁移行過程に能動輸送の関与が明らかとなり、それら予測法の妥当性が問題視されている。<sup>30)</sup> 既存の方法がすべての薬物に適用することが出来ないことは先に述べた。しかし、これは薬物の輸送に能動輸送が関与しているかどうかは明らかでないため、それら方法が十分に利用されていないとも考えられる。もし、著者らの構築した培養細胞系によって能動輸送の関与を明らかに出来るならば、既存の予測方法を適用可能な薬物とそうでない薬物に分類することが可能になる。さらに、培養細胞系の輸送機能が *in vivo* と同等であれば、正確に乳汁移行性を評価できるかもしれない。

本章では、薬物の乳汁移行過程における輸送担体の関与および生理的条件下での乳腺上皮細胞を介した分布特性、および既存の  $M/P$  予測値を  $M/P_{AUC}$  および  $M/P_{ss}$  と比較した。

薬物の乳汁中への移行が受動拡散に支配されていると仮定した *in vitro* 予測法が報告され、Atkinson らの方法は、 $pK_a$ 、血漿中タンパク非結合率、および  $pH7.2$ での  $n$ -オクタノール/水分配係数の 3つのみのパラメータから予測が可能であり、<sup>23)</sup> 能動輸送の介在のない薬物の乳汁移行性を予測するために容易に用いることが出来ると考えられる。しかし、乳汁移行過程に能動輸送が関与して

いる薬物の乳汁移行性予測に用いることは困難であるため、既存の予測法を有効活用するためには乳腺上皮細胞で能動輸送されるかどうかを評価することが必要である。

著者は、モデル薬物として atenolol, cimetidine, および verapamil を選択し、培養細胞系を用いてそれら薬物の乳腺上皮細胞を介した輸送における担体の関与を検討した。仮に、輸送担体の介在がなければ、乳腺上皮細胞を隔てた薬物の分配は受動拡散で説明でき、pH 分配仮説に従う。そのとき、分子型薬物のみが単層膜を透過することができるため、その透過性は分子型薬物濃度の関数として表されるため、<sup>66)</sup> 輸送実験では A 側および B 側の両コンパートメントを同一の pH 値に設定した条件、つまり pH 勾配非存在下では、それらの分子型薬物濃度は等しく、A 側から B 側方向および B 側から A 側方向への透過性は等しくなる。さらに、平衡状態での両コンパートメント間での薬物分布比は速度定数の比に等しいため、1 となる。しかし、能動輸送が関与している場合、透過性に方向性が観察されるため、平衡状態での分布比は 1 にはならない。

両コンパートメントの pH 値を 7.4 にした輸送実験によりモデル薬物の透過性を評価するために、見かけの透過係数 ( $P_{app}$ ) を eq. 12 によって算出し、<sup>52)</sup> また mannitol の  $P_{app}$  も同様に算出した。

$$P_{app} = \frac{[X]_{receiver}}{A \times t \times [C]_{donor}} \quad \cdots \text{eq. 12}$$

$[X]_{receiver}$  : ある時間  $t$  でのモデル薬物または mannitol のレシーバーチャンバー中の累積透過薬物量

$A$  : cell culture insert の有効透過面積

$[C]_{donor}$  : ドナーチャンバー中のモデル薬物または mannitol の濃度

さらに、mannitol の透過を内部標準としてモデル薬物の  $P_{app}$  ( $P_{app, model}$ ) を mannitol の  $P_{app}$  ( $P_{app, mannitol}$ ) で除することにより透過係数比 ( $P_{app, ratio}$ ) を算出した (eq. 13). <sup>67)</sup>

$$P_{app, ratio} = \frac{P_{app, model}}{P_{app, mannitol}} \quad \cdots \text{eq. 13}$$

さらに、培養乳腺上皮細胞を介した分配を評価するために  $P_{app}$  ratio の A 側から B 側方向に対する B 側から A 側方向の比 ((B-A)/(A-B) ratio) を算出した (eq. 14).

$$(B-A)/(A-B) \text{ratio} = \frac{P_{app} \text{ratio}_{(B-A)}}{P_{app} \text{ratio}_{(A-B)}} \cdots \text{eq. 14}$$

輸送実験の結果を Table 7 に示す. cimetidine は、pH 勾配非存在下で A 側から B 側方向への輸送がその逆方向の輸送よりも有意に高かった ( $1.01 \pm 0.047$  vs.  $0.86 \pm 0.024$ ,  $p < 0.05$ , Table 7). しかし、atenolol および verapamil では、pH 勾配非存在下で両方向からの輸送の間に有意差は観察されず ( $p > 0.05$ , Table 7), 両薬物の (B-A)/(A-B) ratio はそれぞれ 0.96 および 0.95 だった. そのため、cimetidine では、pH 勾配非存在下で輸送方向性が観察され、乳腺上皮細胞を介した移行に輸送担体が関与しているが、atenolol および verapamil の (B-A)/(A-B) ratio がほぼ 1 であることから、それらの移行に輸送担体が関与していないと考えられた.

多くの薬物は、 $pK_a$  に依存して生理的 pH ではイオン型で存在し、<sup>60, 68)</sup> 非イオン型薬物は、イオン型薬物よりも膜透過性が非常に高く、生体内 pH の局所

Table 7. Permeability of model drugs across t-HMEC monolayers in absence of pH gradient and involvement of carrier-mediated transport

	$P_{app}$ ratio <sup>a</sup>		Carrier-mediated transport
	A - B	B - A	
<b>Cimetidine</b>	<b><math>1.01 \pm 0.04</math></b>	<b><math>0.86 \pm 0.02^*</math></b>	○
<b>Atenolol</b>	<b><math>0.87 \pm 0.03</math></b>	<b><math>0.84 \pm 0.02</math></b>	×
<b>Verapamil</b>	<b><math>2.75 \pm 0.52</math></b>	<b><math>2.60 \pm 0.26</math></b>	×

Each value represents means  $\pm$  S.E.M. (n=3-4)

\*  $p < 0.05$ , compared with the value in apical to basal direction.

<sup>a</sup>  $P_{app} \text{ ratio} = P_{app, \text{ model drug}} / P_{app, \text{ mannitol}}$



変化は薬物の分布に大きく影響する。<sup>69, 70)</sup> 乳汁の pH は、産後一週間の初乳で約 7.7 であるのに対して、成熟乳では約 6.8 と変動し、<sup>70, 71)</sup> 授乳期間によっては M/P が大きく変動する薬物もあると考えられる。そのため、血液－乳汁間の薬物の分布を培養モデルによる評価において、生理的条件下での実験が必要である。授乳期間中の平均 pH は 7.2 と報告されていることから、<sup>70, 71)</sup> B 側コンパートメントの pH を血漿 pH7.4 および A 側コンパートメントを乳汁の平均 pH7.2 として輸送実験を行い、先の実験と同様に  $P_{app}$  ,  $P_{app}$  ratio, および (B-A)/(A-B) ratio を算出した。

Table 8 に  $P_{app}$  ratio, (B-A)/(A-B) ratio および in vivo データの解析によって得られた  $M/P_{AUC}$  を示す。生理的条件下では、atenolol および cimetidine の B-A/A-B ratio は、1 より大きく、verapamil はそれらとは逆に 1 より小さかった。このことは、atenolol および cimetidine が血液中より乳汁中へ分布しやすく、verapamil は乳汁中へ分布しにくいことを示唆する (Table 8)。一方、 $M/P_{AUC}$  は、atenolol, cimetidine および verapamil でそれぞれ 2.9, 1.7 および 0.6 であり、 $M/P_{ss}$  は 1.47, 3.21 (verapamil は解析可能なデータがない) であった。これらは、(B-A)/(A-B)

Table 8. Permeability of model drugs across t-HMEC monolayers in presence of pH gradient

	$P_{app}$ ratio <sup>a</sup>		(B-A)/(A-B) ratio <sup>b</sup>	$M/P_{AUC}$ <sup>c</sup>
	A - B	B - A		
Cimetidine	0.84 ± 0.03	1.31 ± 0.25*	1.64	1.70
Atenolol	0.66 ± 0.07	0.81 ± 0.05 *	1.21	2.90
Verapamil	2.87 ± 0.30	2.77 ± 0.44	0.97	0.60

Each value represent means ± S.E.M. (n=3-4)

\* $p < 0.05$ , compared with the value in apical to basal direction.

<sup>a</sup>  $P_{app}$  ratio =  $P_{app, \text{ model drug}} / P_{app, \text{ mannitol}}$

<sup>b</sup> (B-A)/(A-B) ratio = Average  $P_{app}$  ratio, B-A / Average  $P_{app}$  ratio, A-B

<sup>c</sup> Reference Atkinson et al., *Clin. Pharmacokinet.*, 1990.

ratio と同様に atenolol および cimetidine では、1 より大きく、verapamil はそれら二薬物とは逆に 1 より小さかった。Table 8 から明らかなように、 $(B-A)/(A-B)$  ratio と  $M/P_{AUC}$  では絶対値が異なるものの、方向性が一致することから、培養細胞系を用いることによって定性的に乳汁－血液間の分配を評価できると考えられた。今後、定量的な評価を可能にするためには、輸送担体の発現に関する定量的な検討や培養系で再現できていない現象の解明が必要であると考えられる。

### 第三章 小括および考察

本編では、臨床データのない薬物の乳汁移行性を評価できる方法を構築するために、ヒト乳腺上皮細胞を用いた培養系に着目した。これまで、薬物の乳汁移行は受動拡散に従うとされてきたが、近年、能動輸送系の関与が明らかとなり、両輸送系を反映した乳汁移行性の評価が必要である。さらに、薬物の乳汁移行は授乳期特有の現象であり、経細胞輸送を評価できる機能分化した乳腺上皮細胞単層膜を形成しなければならない。

Schmidhauser らは、COMMA-1D 細胞から機能分化した細胞グループを選択的に回収することに成功し、<sup>50)</sup> さらに Toddywalla ら<sup>52)</sup> や Gerk らは<sup>53)</sup>、その細胞を用いてタイトな単層膜を形成し、乳腺細胞を介した能動輸送の存在を明らかにしたことから、著者は、Schmidhauser らの培養方法を HMEC に応用して t-HMEC を培養した (Fig. 11)。

3-t-HMEC は、最もタイト ( $P_{app, \text{mannitol}} < 2.6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) であり、Toddywalla らが透過実験において設定した条件、すなわち mannitol の透過係数が  $3.9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  を満たした。これまでに、ヒト授乳期乳腺上皮における TER および mannitol の透過性に関する報告がないが、3-t-HMEC は、細胞間隙の透過を抑えた単層膜であり、HMEC を介した輸送特性を評価するために有用であると考えられた。さらに、この単層膜が授乳期機能を反映するかを検討するために機能分化のマーカーである  $\beta$ -casein の発現を確認した。Schmidhauser らは、trypsin 処理時間の増加に伴って、 $\beta$ -casein 産生細胞の含有量が増加したと報告している。<sup>50)</sup> 本研究では、mRNA レベルでは、2-t、および 3-t-HMEC で発現が確認され、タンパク質レベルでは、3-t-HMEC のみで確認された。この結果は、trypsin 処理回数の増加が  $\beta$ -casein mRNA およびタンパクの発現を促進したと考えられ、Schmidhauser らの報告に一致した。3-t-HMEC での TER の上昇は、接着に関わるタンパク質の発現の増加により説明することができる。そのタンパク質の中に含まれている細胞間連絡路として働く gap junction が、乳腺上皮細胞での  $\beta$ -casein タンパクの産生に関係しており、<sup>73)</sup> trypsin 処理が gap junction 形成に影響を及ぼしているかもしれない。

3-t-HMEC は機能分化したタイトな単層膜を形成した。3-t-HMEC 単層膜を用いて、TEA を基質とした輸送研究では、B 側から A 側への透過が、A 側から B 側方向へのそれよりも有意に高かった ( $P < 0.05$ )。しかし、1-t および 2-t-HMEC では、そのような有意な輸送方向性は観察されなかった ( $P > 0.05$ )。したがって、3-t-HMEC 単層膜は、薬物の経細胞輸送を評価するための有用なツールになると考えられる。t-HMEC において TEA を基質とする hOCT1 および hOCT3 の両方の発現が確認され、これら二つのトランスポーターが 3-t-HMEC の basal membrane を介した TEA 取り込みに関与し、輸送方向性に寄与していると推察された。

授乳期 HMEC は、hOCT1 および hOCT3 以外にカチオン性物質を基質とするトランスポーターを発現していることが明らかになっている。<sup>35)</sup> 例えば、OCTN1, OCTN2, および multi-drug resistance protein 1 (MDR1) があり、これらはすべて apical membrane での発現が報告されている。<sup>74-76)</sup> また、細胞内への取り込みトランスポーターである OCTN1 および OCTN2 は、A 側から B 側へ基質を輸送し、<sup>77)</sup> 乳児の薬物曝露を防ぐ働きをするのかもしれない。しかし、MDR1 は apical membrane に発現する排出トランスポーターであるため、<sup>76)</sup> 乳汁方向への基質の輸送を促進する可能性があり、MDR1 は基質となる薬物への乳児の曝露を引き起こすかもしれない。

Cimetidine は、これらトランスポーターとの相互作用が明らかとなっている。輸送実験より、pH 勾配非存在下では B 側方向への輸送がその逆方向に比べて有意に高く ( $p < 0.05$ )、血液方向へ cimetidine を輸送する担体の関与が示唆され、OCTNs が強く関与しているかもしれない。一方、生理的条件下では、pH 勾配非存在下と方向性が異なり、A 側方向への輸送が有意に高く ( $p < 0.05$ )、生理的条件下では乳汁中へ移行しやすいことが明らかとなり、この結果は  $M/P_{AUC}$  および  $M/P_{ss}$  と一致していた。カチオン性薬物では、その輸送が受動拡散に支配されるとき、A 側の pH の 7.4 から 7.0 への低下によって分子型薬物濃度が減少するため、A 側から B 側方向への輸送も減少する。また、その pH 範囲内での B 側から A 側方向への輸送は、影響されないことが明らかとなっている。<sup>79)</sup> Cimetidine においても pH 勾配非存在下と比べて生理学条件下では B 側方向への輸送の減少が推察され、実験結果はその推察に一致する。しかし、pH 分配仮

説に従った予測値 (1.12) より (B-A)/(A-B) ratio (1.54) ははるかに大きく、A 側 pH の変化による B 側から A 側方向への輸送の増大および輸送方向性の変化は、apical membrane 上での pH 依存的な機能を有する輸送担体の関与が示唆される。これまでの報告から、OCTN1 の取り込み機能が pH の減少によって低下するため、<sup>74)</sup> cimetidine が OCTN1 の基質となりうるなら、生理学的条件下 (A 側 pH 7.2) の実験ではその取り込み機能の低下が輸送方向性の変化に起因しているかもしれない。また、apical membrane 上に発現する ATP 依存的なトランスポーターである breast cancer resistance protein (BCRP) は、細胞内からの排出輸送にかかわっており、Jonker らによって cimetidine のマウスでの乳汁移行において重要な働きをしていることが明らかにされた。<sup>79)</sup> これまでに、BCRP の pH 依存性に関する報告はないが、apical membrane を介した cimetidine の乳汁移行を考慮する際、BCRP の関与を無視することは出来ないであろう。Atenolol は、pH 勾配非存在下での輸送が受動拡散に支配され、さらに A 側の pH の 7.4 から 7.2 への低下によって分子型薬物濃度の減少による A 側から B 側方向への輸送の減少が観察された。また、その pH 変化によって B 側から A 側方向への輸送が影響されないことから、atenolol の乳汁移行に輸送担体の関与の可能性は低いと考えられた。verapamil は、MDR1 の基質となることが報告されている。しかし、MDR1 mRNA の発現は、非授乳期に比べて授乳期では減少し、さらに正常ヒト乳腺上皮細胞株である MCF12A では、そのタンパク質が細胞膜上に局在しないことが示されている (Ito et al., unpublished)。このことから、授乳期乳腺では MDR1 は細胞膜上での輸送機能を発現しない可能性が考えられ、verapamil の輸送方向性が観察されなかった結果は妥当かもしれない。しかし、生理的条件下での実験において A 側から B 側方向への輸送の減少が観察されず、pH 勾配非存在下での実験結果と変わらなかったことは、pH 依存的な輸送担体の関与を完全に否定できるものではなかった。

上記の 3-t-HMEC を用いた in vitro 透過実験の結果および既存の M/P の予測値と M/P<sub>AUC</sub> および M/P<sub>ss</sub> との比較を Table 9 に示し、評価系としての可能性を考察した。Verapamil の M/P<sub>ss</sub> は、解析に必要なデータが無いために、ここに示す 3 薬物においては、M/P<sub>ss</sub> と M/P<sub>AUC</sub> がほぼ等しいものとして考察すると、pH 勾配を設定した 3-t-HMEC の値 (A)、(D) および (E) は乳汁中と血液中の濃度

の大小関係（M/P が 1 より大きい小さいか）は推定できているものの臨床データを反映するには不十分であった。しかし、(D) および (E) は能動輸送を反映する根拠がないのに対し、(A) は能動輸送を反映している可能性がある。一方、本研究での pH 勾配を設けない実験 (B) および血液と乳汁の pH の違いのみを考慮に入れた (C) では、正しい予測は難しいと考えられた。今後、3-t-HMEC を用いた方法をより高感度で、かつ定量的にするために、輸送担体の発現に関する定量的な検討や、能動輸送以外の薬物の移行過程における培養系とヒト乳腺組織の差異についての解明が必要である。

Table 9. Comparison of experimental data with various M/P

	(B-A) / (A-B) ratio <sup>a</sup>		Physicochemical prediction			Clinical data	
	pH gradient		Mu/Pu <sup>b</sup>	M/Pphase <sup>c</sup>	M/P'phase <sup>d</sup>	M/P <sub>AUC</sub> <sup>e</sup>	M/Pss
	+	—					
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)
Cimetidine	1.54	0.85	1.12	6.84	3.06	1.70	1.47
Atenolol	1.21	0.97	1.58	1.52	2.83	2.90	3.21
Verapamil	0.95	0.95	1.57	0.54	0.70	0.60	—

<sup>a</sup> (B-A)/(A-B) ratio = Average  $P_{app}$  ratio, B-A / Average  $P_{app}$  ratio, A-B

<sup>b</sup> Prediction equation is derived from the pH partitioning theory.

<sup>c</sup> Prediction equation is the function of partition coefficients from plasma to milk lipid and plasma to milk protein.

<sup>d</sup> The equation of (D) is logarithmically transformed and regressed to  $M/P_{AUC}$ . This equation having contribution ratio of term is used as prediction equation.

<sup>e</sup> Reference Atkinson et al., *Clin. Pharmacokinet.*, 1990.

## 結 論

以上、著者は二編にわたり、薬物の乳汁移行性評価法について検討し、第一編では、臨床データのある薬物では、そのデータを活用して乳汁移行性を正確に見積もるための方法、第二編では、臨床データのない薬物の場合、授乳婦が薬物を服用してそのときの乳汁を採取することは倫理的にも困難であることが予想されるため、臨床データを用いない *in vitro* 予測法が必要であり、その方法の構築を試み、次の結論を得た。

### 1. 薬物の乳汁移行性を評価するための新規薬物動態学モデルの構築と提案

臨床データのある薬物では、経時的に血漿中および乳汁中薬物濃度が測定されているが、これまではそのデータの動態学的解析を可能にする方法はなかった。そこで、著者は臨床データの解析により乳汁移行性評価が可能なコンパートメントモデルによる方法を構築した。

著者は、乳汁中への薬物移行は乳腺上皮細胞を介した排泄現象であるとみなし、この排泄が、乳汁産生とは独立した一次の速度定数  $k_{ex}$  に従うと仮定した (Fig. 1b)。さらに、ブレストコンパートメントは乳汁および薬物が排泄される一次貯蔵コンパートメントであり、授乳によりそれらが体外へと最終的に排泄されるモデルとした (Fig. 2)。また、著者は、M/P を定速静注時の定常状態における乳汁中对血中薬物濃度比 ( $M/P_{ss}$ ) と定義し、M/P は、経口投与あるいは定速静注後の血漿中および乳汁中薬物濃度の解析により得られた速度論パラメータと、乳汁産生速度 ( $Z$ ) の関数として表現した。そして、ブレストコンパートメントを含む最も高次のモデルとして4コンパートメントモデルを構築し (Fig. 2)、 $M/P_{ss}$ 、 $C_1$  および  $C_m$  それぞれの理論式を導き、解析を行った。

ヒトの血中および乳汁中薬物濃度が測定されている論文を検索し、7 種の薬物の解析を行ったところ、alprazolam, atenolol, および cimetidine の  $M/P_{ss}$  は、論文中で報告されている  $M/P_{AUC}$  にほぼ一致した。また, amoxicillin, cefadroxil, cefalexin, および nizatidine に関する M/P は  $M/P_{conc}$  としてしか報告されておらず、あらためて、妥当な M/P である  $M/P_{ss}$  が得られ、授乳婦に対して臨床的使

用頻度の高いこれら抗生物質 (amoxicillin, cefadroxil, および cefalexin) の M/P は小さく, また, H<sub>2</sub> 遮断薬として使用頻度の高い nizatidine が, 比較的乳汁中へと移行しやすい薬物であることを明らかにした. さらに, 得られたパラメータを用いることで, 用法用量や授乳スケジュールの違いによる乳児の薬物曝露の計算が可能になった.

## 2. ヒト乳腺上皮細胞を用いた in vitro 乳汁移行性評価モデルの構築

臨床データの無い薬物では, 授乳婦が薬物を服用してそのときの乳汁を採取することは倫理的にも入手困難であることが予想されるため, 臨床データを用いない in vitro 予測法が必要であり, HMEC を用いてその方法の構築を試みた. その結果, 授乳期機能を有する単層膜の形成に成功した. ヒト細胞での成功は本研究が初めてである.

著者は, Schmidhauser らの培養方法<sup>50)</sup> を改良し, HMEC を trypsin 処理することによって t-HMEC を培養した. 3 回までの trypsin 処理を受けた HMEC (1-t, 2-t, および 3-t-HMEC) を単層培養してそれぞれの細胞単層膜の機能を評価した. 3-t-HMEC は, 最もタイトな単層膜を形成し,  $\beta$ -casein を発現しており, 授乳期機能を有する単層膜であることが明らかとなった. さらに, その単層膜を介した TEA 輸送は, 血液側方向より乳汁側方向への有意な方向性が観察され, TEA を基質とする hOCT1 および hOCT3 の発現も観察された. このことから, 3-t-HMEC 単層膜は, 授乳期機能を有する能動輸送系を発現していると考えられた. その単層膜の有用性を評価するために, pH 勾配存在下および pH 勾配非存在下での薬物の輸送実験を行ったところ, この単層膜は輸送担体の関与を明らかにでき, また乳汁-血液間の薬物の分布を定性的に評価できることが示された.

以上のことより, 薬物の乳汁移行は, 臨床データのある薬物ではモデルによる解析により評価が可能になり, 一方, 臨床データの無い薬物では, in vitro 培養モデルを用いることによって, 定性的な評価が可能になった. 今後, 培養モデルでの定量的な評価を可能にするためには, さらに詳細な検討が必要である.

今後, 本研究で構築した方法は, 臨床上および医薬品の開発段階において授乳の安全性を評価するために有用であり, 利用されることが期待される.



## 謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学部病院薬剤学講座教授 森本雍憲先生に深意なる謝意を表します。

また、本研究に際して、始終御指導並びに御激励を賜りました城西大学薬学部医薬品情報学講座教授 小林大介先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、有益な御意見並びに御指導を賜りました城西大学薬学部病態解析学講座教授 小林順先生、城西大学薬学部病院薬剤学講座助教授 大井一弥先生、城西大学薬学部病院薬剤学講座助手 上田秀雄先生、城西大学大学院薬学研究科助手 沼尻幸彦先生に深謝の意を表します。

また、本研究の一部御協力頂きました小川産婦人科小児科理事長 小川勇美先生、ならびに富山医科薬科大学薬学部薬剤学講座教授 細谷健一先生に深謝の意を表します。

さらに、本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学薬学部衛生化学講座教授 川嶋洋一先生並びに城西大学薬学部薬理学講座教授 谷覺先生に深謝の意を表します。

最後に、本研究に御協力頂いた城西大学薬学部病院薬剤学講座諸氏に深く感謝致します。

# 付 録

## 4-inf-P モデルの解法

### 定速静注時の $C_p$ , $C_m$ , M/Pss の理論式

$$\frac{dX_1}{dt} = K_0 - (k_{el} + k_{12} + k_{13})X_1 + k_{21}X_2 + k_{31}X_3$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}X_1 - (k_{ex} + k_{21})X_2$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{13}X_1 - k_{31}X_3$$

$$SX_1 - X_{1(0)} = \frac{K_0}{S} - (k_{el} + k_{12} + k_{13})X_1 + k_{21}X_2 + k_{31}X_3$$

$$SX_2 - X_{2(0)} = k_{12}X_1 - (k_{ex} + k_{21})X_2$$

$$SX_3 - X_{3(0)} = k_{13}X_1 - k_{31}X_3$$

$$(S + k_{el} + k_{12} + k_{13})X_1 - k_{12}X_2 - k_{13}X_3 = \frac{K_0}{S}$$

$$-k_{12}X_1 + (S + k_{ex} + k_{21})X_2 = 0$$

$$-k_{13}X_1 + (S + k_{31})X_3 = 0$$

$$\begin{aligned} X_1 &= \frac{\begin{vmatrix} \frac{K_0}{S} & -k_{21} & -k_{31} \\ 0 & (S + k_{ex} + k_{21}) & 0 \\ 0 & 0 & (S + k_{31}) \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} (S + k_{el} + k_{12} + k_{13}) & -k_{21} & -k_{31} \\ -k_{12} & (S + k_{ex} + k_{21}) & 0 \\ -k_{13} & 0 & (S + k_{31}) \end{vmatrix}} \\ &= \frac{\frac{K_0}{S} (S + k_{ex} + k_{21}) (S + k_{31})}{(S + k_{el} + k_{12} + k_{13}) (S + k_{ex} + k_{21}) (S + k_{31}) - k_{13} k_{31} (S + k_{ex} + k_{21}) - k_{12} k_{21} (S + k_{31})} \\ &= \frac{\frac{K_0}{S} (S + k_{ex} + k_{21}) (S + k_{31})}{S^3 + (k_{el} + k_{ex} + k_{12} + k_{13} + k_{21} + k_{31}) S^2 + \left( \begin{aligned} &k_{el} k_{ex} + k_{el} k_{21} + k_{el} k_{31} + k_{ex} k_{12} + k_{ex} k_{13} + k_{ex} k_{31} \\ &+ k_{12} k_{31} + k_{13} k_{21} + k_{21} k_{31} \end{aligned} \right) S} \end{aligned}$$

となり、分母を  $(S+\alpha)(S+\beta)(S+\gamma)$  とおくと

$$\begin{aligned}
X_1 &= \frac{\frac{K_0}{S}(S+k_{ex}+k_{21})(S+k_{31})}{(S+\alpha)(S+\beta)(S+\gamma)} \\
&= \frac{K_0(S+k_{ex}+k_{21})(S+k_{31})}{S(S+\alpha)(S+\beta)(S+\gamma)}
\end{aligned}$$

このとき、

$$\alpha \beta \gamma = k_{el} k_{ex} k_{31} + k_{el} k_{21} k_{31} + k_{ex} k_{12} k_{31}$$

$$\alpha \beta + \beta \gamma + \gamma \alpha = k_{el} k_{ex} + k_{el} k_{21} + k_{el} k_{31} + k_{ex} k_{12} + k_{ex} k_{13} + k_{ex} k_{31} + k_{12} k_{31} + k_{13} k_{21} + k_{21} k_{31}$$

$$\alpha + \beta + \gamma = k_{el} + k_{ex} + k_{12} + k_{13} + k_{21} + k_{31}$$

となる。

ベネットの便法を用いると

$$X_1 = \frac{P(S)}{Q(S)} = \frac{P_1(0)}{Q_1(0)} e^{-0t} + \frac{P_2(-\alpha)}{Q_2(-\alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{P_3(\beta)}{Q_3(\beta)} e^{-\beta t} + \frac{P_4(\gamma)}{Q_4(\gamma)} e^{-\gamma t}$$

で表わされることから、

$$\begin{aligned}
X_1 &= \frac{K_0 k_{31} (k_{ex} + k_{21})}{\alpha \beta \gamma} + \frac{K_0 (k_{ex} + k_{21} - \alpha)(k_{31} - \alpha)}{\alpha(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{K_0 (k_{ex} + k_{21} - \beta)(k_{31} - \beta)}{\beta(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{K_0 (k_{ex} + k_{21} - \gamma)(k_{31} - \gamma)}{\gamma(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \\
&= K_0 \left( \frac{k_{31} (k_{ex} + k_{21})}{\alpha \beta \gamma} + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \alpha)(k_{31} - \alpha)}{\alpha(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \beta)(k_{31} - \beta)}{\beta(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} \right. \\
&\quad \left. + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \gamma)(k_{31} - \gamma)}{\gamma(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right)
\end{aligned}$$

となる。さらに、定常状態 ( $t \rightarrow \infty$ ) では、

$$X_1^\infty = \frac{K_0 k_{31} (k_{ex} + k_{21})}{\alpha \beta \gamma}$$

$$C_1^\infty = \frac{K_0 k_{31} (k_{ex} + k_{21})}{V \alpha \beta \gamma}$$

となる。

$X_1$  と同様に  $X_2$  について解くと

$$\begin{aligned}
X_2 &= \frac{\begin{vmatrix} (S+k_{el}+k_{12}+k_{13}) & \frac{K_0}{S} & -k_{31} \\ -k_{12} & 0 & 0 \\ -k_{13} & 0 & (S+k_{31}) \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} (S+k_{el}+k_{12}+k_{13}) & -k_{21} & -k_{31} \\ -k_{12} & (S+k_{ex}+k_{21}) & 0 \\ -k_{13} & 0 & (S+k_{31}) \end{vmatrix}} \\
&= \frac{K_0 k_{12} (S+k_{31})}{S(S+\alpha)(S+\beta)(S+\gamma)}
\end{aligned}$$

となる。

これをベネットの便法を用いて解くと、

$Q_{1(0)}$ ,  $Q_{2(-\alpha)}$ ,  $Q_{3(-\beta)}$  および  $Q_{4(-\gamma)}$  は、 $X_1$  のときと同じであり、

$$X_2 = K_0 k_{12} \left( \frac{k_{31}}{\alpha \beta \gamma} + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{k_{31} - \beta}{\beta(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right)$$

で表わされる。

乳汁中薬物量は、

$$\begin{aligned} \frac{dX_m}{dt} &= k_{ex} X_2 \\ &= K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31}}{\alpha \beta \gamma} + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{k_{31} - \beta}{\beta(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right) \\ X_m &= K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31}}{\alpha \beta \gamma} \int_0^t dt + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} \int_0^t e^{-\alpha t} dt + \frac{k_{31} - \beta}{\beta(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} \int_0^t e^{-\beta t} dt \right. \\ &\quad \left. + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} \int_0^t e^{-\gamma t} dt \right) \\ &= K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} t}{\alpha \beta \gamma} - \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha^2(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha^2(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} - \frac{k_{31} - \beta}{\beta^2(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} \right. \\ &\quad \left. + \frac{k_{31} - \beta}{\beta^2(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} - \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma^2(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma^2(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} \right) \\ &= K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} t}{\alpha \beta \gamma} - \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha^2(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} (e^{-\alpha t} - 1) - \frac{k_{31} - \beta}{\beta^2(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} (e^{-\beta t} - 1) \right. \\ &\quad \left. - \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma^2(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} (e^{-\gamma t} - 1) \right) \\ &= K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} t}{\alpha \beta \gamma} + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha^2(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} (1 - e^{-\alpha t}) + \frac{k_{31} - \beta}{\beta^2(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} (1 - e^{-\beta t}) \right. \\ &\quad \left. + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma^2(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} (1 - e^{-\gamma t}) \right) \end{aligned}$$

$t=\infty$ のとき

$$X_m^\infty = K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} t}{\alpha \beta \gamma} + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha^2(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} + \frac{k_{31} - \beta}{\beta^2(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma^2(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} \right)$$

となり、 $t_1$  から  $t_2$  時間の間に乳汁中へ移行した薬物量 ( $X_{m(t_2)} - X_{m(t_1)}$ ) は、

$$\begin{aligned} X_{m(t_2)} - X_{m(t_1)} &= K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} t_2}{\alpha \beta \gamma} + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha^2(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} + \frac{k_{31} - \beta}{\beta^2(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma^2(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} \right) \\ &\quad - K_0 k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} t_1}{\alpha \beta \gamma} + \frac{k_{31} - \alpha}{\alpha^2(\alpha - \beta)(\gamma - \alpha)} + \frac{k_{31} - \beta}{\beta^2(\beta - \alpha)(\gamma - \beta)} + \frac{k_{31} - \gamma}{\gamma^2(\gamma - \alpha)(\beta - \gamma)} \right) \\ &= \frac{K_0 k_{ex} k_{12} k_{31}}{\alpha \beta \gamma} (t_2 - t_1) \end{aligned}$$

よって、

$$\begin{aligned} C_m &= \frac{K_0 k_{ex} k_{12} k_{31}}{\alpha \beta \gamma} (t_2 - t_1) \\ &\quad Z(t_2 - t_1) \\ &= \frac{K_0 k_{ex} k_{12} k_{31}}{\alpha \beta \gamma Z} \end{aligned}$$

M/P は,

$$M/P = C_m / C_p = \frac{\frac{K_0 k_{ex} k_{12} k_{31}}{\alpha \beta \gamma Z}}{\frac{K_0 k_{31} (k_{ex} + k_{21})}{V \alpha \beta \gamma}} = \frac{k_{ex} k_{12} V}{(k_{ex} + k_{21}) Z}$$

## 4-po-P モデルの解法

経口投与時の  $C_p$ ,  $C_m$  の理論式

$$\frac{dX_a}{dt} = -k_a X_a$$

$$\frac{dX_1}{dt} = k_a X_a - (k_{el} + k_{12} + k_{13}) X_1 + k_{21} X_2 + k_{31} X_3$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12} X_1 - (k_{ex} + k_{21}) X_2$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{13} X_1 - k_{31} X_3$$

$$SX_a - X_{a(0)} = -k_a X_a$$

$$SX_1 - X_{1(0)} = k_a X_a - (k_{el} + k_{12} + k_{13}) X_1 + k_{21} X_2 + k_{31} X_3$$

$$SX_2 - X_{2(0)} = k_{12} X_1 - (k_{ex} + k_{21}) X_2$$

$$SX_3 - X_{3(0)} = k_{13} X_1 - k_{31} X_3$$

$$X_{a(0)} = FX_0, \quad X_{1(0)} = FX_0, \quad X_{2(0)} = FX_0, \quad X_{3(0)} = FX_0 \text{ があるので,}$$

$$SX_a - FX_0 = -k_a X_a$$

$$SX_1 = k_a X_a - (k_{el} + k_{12}) X_1 + k_{21} X_2 + k_{31} X_3$$

$$SX_2 = k_{12} X_1 - (k_{ex} + k_{21}) X_2$$

$$SX_3 = k_{13} X_1 - k_{31} X_3$$

整理すると,

$$(S + k_a) X_a = FX_0$$

$$-k_a + (S + k_{el} + k_{12}) X_1 - k_{12} X_2 - k_{13} X_3 = 0$$

$$-k_{12} X_1 + (S + k_{ex} + k_{21}) X_2 = 0$$

$$-k_{13} X_1 + (S + k_{31}) X_3 = 0$$

$$\begin{aligned}
X_1 &= \frac{\begin{vmatrix} (S+k_a) & FX_0 & 0 & 0 \\ -k_a & 0 & -k_{21} & -k_{31} \\ 0 & 0 & (S+k_{21}+k_{ex}) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & (S+k_{31}) \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} (S+k_a) & 0 & 0 & 0 \\ -k_a & (S+k_{12}+k_{13}+k_{el}) & -k_{21} & -k_{31} \\ 0 & -k_{12} & (S+k_{21}+k_{ex}) & 0 \\ 0 & -k_{13} & 0 & (S+k_{31}) \end{vmatrix}} \\
&= \frac{\begin{vmatrix} -k_a & -k_{12} & -k_{13} \\ -FX_0 & 0 & (S+k_{21}+k_{ex}) \\ 0 & 0 & (S+k_{31}) \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} (S+k_{el}+k_{12}+k_{13}) & -k_{21} & -k_{31} \\ (S+k_a) & -k_{12} & (S+k_{ex}+k_{21}) \\ -k_{13} & 0 & (S+k_{31}) \end{vmatrix}} \\
&= \frac{FX_0 k_a (S+k_{21}+k_{ex})(S+k_{31})}{(S+k_a)((S+k_{el}+k_{12}+k_{13})(S+k_{ex}+k_{21})(S+k_{31})-k_{13}k_{31}(S+k_{ex}+k_{21})-k_{12}k_{21}(S+k_{31}))} \\
&= \frac{FX_0 k_a (S+k_{21}+k_{ex})(S+k_{31})}{(S+k_a) \left( S^3 + (k_{el}+k_{ex}+k_{12}+k_{13}+k_{21}+k_{31})S^2 + \left( \begin{aligned} &k_{el}k_{ex}+k_{el}k_{21}+k_{el}k_{31}+k_{ex}k_{12}+k_{ex}k_{13}+k_{ex}k_{31} \\ &+k_{12}k_{31}+k_{13}k_{21}+k_{21}k_{31} \end{aligned} \right) S \right.} \\
&\quad \left. + k_{el}k_{ex}k_{31}+k_{el}k_{21}k_{31}+k_{ex}k_{12}k_{31} \right)
\end{aligned}$$

となり、分母を $(S+k_a)(S+\alpha)(S+\beta)(S+\gamma)$ とおくと

$$X_1 = \frac{FX_0 k_a (S+k_{21}+k_{ex})(S+k_{31})}{(S+k_a)(S+\alpha)(S+\beta)(S+\gamma)}$$

ただし、

$$\alpha \beta \gamma = k_{el}k_{ex}k_{31} + k_{el}k_{21}k_{31} + k_{ex}k_{12}k_{31}$$

$$\alpha \beta + \beta \gamma + \gamma \alpha = k_{el}k_{ex} + k_{ex}k_{21} + k_{el}k_{31} + k_{ex}k_{12} + k_{ex}k_{13} + k_{ex}k_{31} + k_{12}k_{31} + k_{13}k_{21} + k_{21}k_{31}$$

$$\alpha + \beta + \gamma = k_{el} + k_{ex} + k_{12} + k_{13} + k_{21} + k_{31}$$

である。

ベネットの便法を用いると

$$X_1 = \frac{P(S)}{Q(S)} = \frac{P(-k_a)}{Q_1(-k_a)} e^{-k_a t} + \frac{P_2(-\alpha)}{Q_2(-\alpha)} e^{-\alpha t} + \frac{P_3(\beta)}{Q_3(\beta)} e^{-\beta t} + \frac{P_4(\gamma)}{Q_4(\gamma)} e^{-\gamma t}$$

で表わされることから、

$$\begin{aligned}
X_1 &= \frac{FX_0 k_a (k_{ex}+k_{21}-k_a)(k_{31}-k_a)}{(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)} e^{-k_a t} + \frac{FX_0 k_a (k_{ex}+k_{21}-\alpha)(k_{31}-\alpha)}{(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)} e^{-\alpha t} \\
&\quad + \frac{FX_0 k_a (k_{ex}+k_{21}-\beta)(k_{31}-\beta)}{(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)} e^{-\beta t} + \frac{FX_0 k_a (k_{ex}+k_{21}-\gamma)(k_{31}-\gamma)}{(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)} e^{-\gamma t} \\
&= FX_0 k_a \left( \begin{aligned} &\frac{(k_{ex}+k_{21}-k_a)(k_{31}-k_a)}{(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)} e^{-k_a t} + \frac{(k_{ex}+k_{21}-\alpha)(k_{31}-\alpha)}{(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)} e^{-\alpha t} \\ &+ \frac{(k_{ex}+k_{21}-\beta)(k_{31}-\beta)}{(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)} e^{-\beta t} + \frac{(k_{ex}+k_{21}-\gamma)(k_{31}-\gamma)}{(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)} e^{-\gamma t} \end{aligned} \right)
\end{aligned}$$

となる。

よって、血中濃度は、

$$C_1 = \frac{FX_0 k_a}{V} \left( \frac{(k_{ex} + k_{21} - k_a)(k_{31} - k_a)}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} e^{-k_a t} + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \alpha)(k_{31} - \alpha)}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} \right. \\ \left. + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \beta)(k_{31} - \beta)}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{(k_{ex} + k_{21} - \gamma)(k_{31} - \gamma)}{(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right)$$

となる。

$X_1$ と同様に  $X_2$  について解くと次のようにあらわされる。

$$X_2 = \frac{\begin{vmatrix} (S + k_a) & FX_0 & 0 & 0 \\ -k_a & 0 & (S + k_{12} + k_{13} + k_{el}) & -k_{31} \\ 0 & 0 & -k_{12} & 0 \\ 0 & 0 & -k_{13} & (S + k_{31}) \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} (S + k_a) & 0 & 0 & 0 \\ -k_a & (S + k_{12} + k_{13} + k_{el}) & -k_{21} & -k_{31} \\ 0 & -k_{12} & (S + k_{21} + k_{ex}) & 0 \\ 0 & -k_{13} & 0 & (S + k_{31}) \end{vmatrix}} \\ = \frac{FX_0 k_a k_{12} (S + k_{31})}{(S + k_a)(S + \alpha)(S + \beta)}$$

ベネットの便法を用いて解くと

$Q_{1(0)}$ ,  $Q_{2(-\alpha)}$ ,  $Q_{3(-\beta)}$ , および  $Q_{4(-\gamma)}$  は,  $X_1$  のときと同じであり,

$$X_2 = FX_0 k_a k_{12} \left( \frac{k_{31} - k_a}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} e^{-k_a t} + \frac{k_{31} - \alpha}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \beta}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{k_{31} - \gamma}{(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right)$$

で表わされる。

乳汁中薬物量は、

$$\frac{dX_m}{dt} = k_{ex} X_2 \\ = FX_0 k_a k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} - k_a}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} e^{-k_a t} + \frac{k_{31} - \alpha}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \beta}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{k_{31} - \gamma}{(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right) \\ \int_0^t dX_m = FX_0 k_a k_{ex} k_{12} \int_0^t \left( \frac{k_{31} - k_a}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} e^{-k_a t} + \frac{k_{31} - \alpha}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} e^{-\alpha t} \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \beta}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} e^{-\beta t} + \frac{k_{31} - \gamma}{(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} e^{-\gamma t} \right) dt \\ X_{m(t)} - X_{m(0)} = FX_0 k_a k_{ex} k_{12} \left( \frac{k_{31} - k_a}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)(\gamma - k_a)} \int_0^t e^{-k_a t} dt + \frac{k_{31} - \alpha}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)(\gamma - \alpha)} \int_0^t e^{-\alpha t} dt \right. \\ \left. + \frac{k_{31} - \beta}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)(\gamma - \beta)} \int_0^t e^{-\beta t} dt + \frac{k_{31} - \gamma}{(k_a - \gamma)(\alpha - \gamma)(\beta - \gamma)} \int_0^t e^{-\gamma t} dt \right)$$

$X_{m(0)}=0$  なるので

$$\begin{aligned}
 X_{m(t)} &= FX_0 k_a k_{cs} k_{12} \left( -\frac{k_{31}-k_a}{k_a(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)}(e^{-k_d t}-1) - \frac{k_{31}-\alpha}{\alpha(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)}(e^{-\alpha t}-1) \right. \\
 &\quad \left. - \frac{k_{31}-\beta}{\beta(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)}(e^{-\beta t}-1) - \frac{k_{31}-\gamma}{\gamma(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)}(e^{-\gamma t}-1) \right) \\
 &= FX_0 k_a k_{cs} k_{12} \left( \frac{k_{31}-k_a}{k_a(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)}(1-e^{-k_d t}) + \frac{k_{31}-\alpha}{\alpha(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)}(1-e^{-\alpha t}) \right. \\
 &\quad \left. + \frac{k_{31}-\beta}{\beta(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)}(1-e^{-\beta t}) + \frac{k_{31}-\gamma}{\gamma(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)}(1-e^{-\gamma t}) \right)
 \end{aligned}$$

となり、 $t_1$  から  $t_2$  時間の間に乳汁中へ移行した薬物量 ( $X_{m(t_2)} - X_{m(t_1)}$ ) は、

$$\begin{aligned}
 X_{m(t_2)} - X_{m(t_1)} &= FX_0 k_a k_{cs} k_{12} \left( \frac{k_{31}-k_a}{k_a(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)}(1-e^{-k_d t_2}) + \frac{k_{31}-\alpha}{\alpha(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)}(1-e^{-\alpha t_2}) \right. \\
 &\quad \left. + \frac{k_{31}-\beta}{\beta(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)}(1-e^{-\beta t_2}) + \frac{k_{31}-\gamma}{\gamma(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)}(1-e^{-\gamma t_2}) \right) \\
 &\quad - FX_0 k_a k_{cs} k_{12} \left( \frac{k_{31}-k_a}{k_a(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)}(1-e^{-k_d t_1}) + \frac{k_{31}-\alpha}{\alpha(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)}(1-e^{-\alpha t_1}) \right. \\
 &\quad \left. + \frac{k_{31}-\beta}{\beta(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)}(1-e^{-\beta t_1}) + \frac{k_{31}-\gamma}{\gamma(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)}(1-e^{-\gamma t_1}) \right) \\
 &= FX_0 k_a k_{cs} k_{12} \left( \frac{k_{31}-k_a}{k_a(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)}(e^{-k_d t_1} - e^{-k_d t_2}) \right. \\
 &\quad + \frac{k_{31}-\alpha}{\alpha(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)}(e^{-\alpha t_1} - e^{-\alpha t_2}) \\
 &\quad + \frac{k_{31}-\beta}{\beta(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)}(e^{-\beta t_1} - e^{-\beta t_2}) \\
 &\quad \left. + \frac{k_{31}-\gamma}{\gamma(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)}(e^{-\gamma t_1} - e^{-\gamma t_2}) \right) \\
 C_m &= \frac{FX_0 k_a k_{cs} k_{12}}{Z(t_2-t_1)} \left( \frac{k_{31}-k_a}{k_a(\alpha-k_a)(\beta-k_a)(\gamma-k_a)}(e^{-k_d t_1} - e^{-k_d t_2}) \right. \\
 &\quad + \frac{k_{31}-\alpha}{\alpha(k_a-\alpha)(\beta-\alpha)(\gamma-\alpha)}(e^{-\alpha t_1} - e^{-\alpha t_2}) \\
 &\quad + \frac{k_{31}-\beta}{\beta(k_a-\beta)(\alpha-\beta)(\gamma-\beta)}(e^{-\beta t_1} - e^{-\beta t_2}) \\
 &\quad \left. + \frac{k_{31}-\gamma}{\gamma(k_a-\gamma)(\alpha-\gamma)(\beta-\gamma)}(e^{-\gamma t_1} - e^{-\gamma t_2}) \right)
 \end{aligned}$$



# 実験の部

## 第二編の実験方法

### 【1】試薬

ヒト乳腺上皮細胞基準培地(MEBM<sup>®</sup>)と乳腺上皮細胞添加因子セット(MEGM<sup>®</sup> SingleQuots)の二つからなるヒト乳腺上皮細胞専用培地(MEGM<sup>®</sup>)キット, および 0.025 % trypsin / 0.01 % EDTA, trypsin neutralizing solution(TNS), hepes buffered saline solution(HBSS)の三つからなるサブカルチャー用試薬パックは, Cambrex BioScience Wakersvill Inc. (MD, U.S.A) から購入した. EHS 肉腫由来の細胞外基質である Matrigel<sup>®</sup> は, BD Biosciences (CA, U.S.A) から購入した. [1-<sup>3</sup>H] D-mannitol (20 Ci/mmol), [ethyl-1-<sup>14</sup>C]TEA (55.4 mCi/mmol), [glycyl-1-<sup>14</sup>C]PAH (55 mCi/mmol) および [N-methyl-<sup>3</sup>H]verapamil (8 Ci/mmol) は, American Radiolabeled Chemicals Inc.より購入し, [N-methyl-<sup>3</sup>H]cimetidine (25 Ci/mmol) は, Amersham Biosciences UK Ltd. (Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.) より購入し, [ring-<sup>3</sup>H]atenolol (7.3 Ci/mmol) および D-[1-<sup>14</sup>C]mannitol (53 mCi/mmol) は, Moravsek Biochemicals, Inc. (CA, U.S.A) より購入した. その他の試薬は, Sigma Chemicals co. (MO, U.S.A) から購入した.

### 【2】細胞培養

#### 1. 細胞

HMEC (Cambrex BioScience Wakersvill Inc.)を用いた.

#### 2. Matrigel<sup>®</sup>コートしたディッシュおよび cell culture insert の調製

-20 °Cで保存された Matrigel<sup>®</sup> を一晩かけて 4 °Cで解凍した. そして, 氷冷下, 解凍した Matrigel<sup>®</sup> を MEBM<sup>®</sup> で 250 µg/mL に希釈し, コーティング溶液を調製した. コーティング溶液を 100 mm ディッシュ (IWAKI) に 8 mL, 24 well-cell culture insert (Becton, Dickinson and company, NJ, U.S.A) に 125 µL/well, 12 well-cell culture insert (Becton, Dickinson and company, NJ, U.S.A) に 360 µL/well 入れ,

37 °Cで3時間インキュベートし、Matrigel® をポリメライズさせた。インキュベート後、クリーンベンチ内で数分間放置し、余分な溶液を除去した。最後に、コーティング部分を phosphate buffered saline solution (PBS) で洗浄し乾燥させた。

### 3. 培地調製

培養には、MEBM® に MEGM® プレットキット (insulin, hEGF, hydrocortisone, amphotericin-B, gentamicin, ウシ脳下垂体抽出物) を添加し、MEGM® を調製した。この MEGM® を用いて、最終濃度が 10 µg/mL の prolactin 添加 MEGM® を調製した。ただし、trypsin 処理によって剥がれた細胞の培養には、hEGF は除去した prolactin 添加 MEGM® である differentiation medium を用いた。

### 4. t-HMEC の培養方法

t-HMEC は、HMEC をディッシュ上で培養し増殖後に trypsin 処理し、その処理により剥離した細胞であり、Schmidhauser らの方法を模倣して培養した。以下に詳細を示す。凍結保存した HMEC を 37 °C の水浴で融解し、血球計数盤を用いて細胞数を計数した。Matrigel® コートした 100 mm ディッシュに HMEC を播種密度 100,000 cells/ディッシュで播種し、37 °C/5 % CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。このときの培地は、MEGM® を用いた。80% confluent 到達後、trypsin 処理し、ディッシュ から剥がれなかった HMEC を同じディッシュ上で継続して培養した。再び 80% confluent 到達後、trypsin 処理を行い、ディッシュ上での培養と trypsin 処理を合計 3 回繰り返した。各々の trypsin 処理により剥がれてきた細胞は、trypsin 処理の回数に基づき 1-t、2-t、および 3-t-HMEC と呼ぶことにした (Fig. 11)。

t-HMEC は、Matrigel® コートした cell culture insert 上で、TER 測定および輸送実験のためのもの、また、Matrigel® コートした 60 mm ディッシュ上で、RT-PCR のためのものをそれぞれ培養した。このときの培地は、differentiation medium で、cell culture insert は、面積が 0.9 cm<sup>2</sup>、または 0.33 cm<sup>2</sup>、ポアサイズは 1.0 µm のものを用いた。

80 % confluent の細胞は、顕微鏡 (MO21, OLYMPUS, Tokyo) により観察し、TER は、チョップスティックエレクトロードを備えた Millicell ERS® (MILLIPORE, MA, U.S.A.) で測定した。

### 【3】Trypsin 処理を応用したヒト乳腺上皮細胞培養法に関する検討

#### 1. t-HMEC の形態学的評価

1 回から 4 回までの trypsin 処理を受けた細胞を Matrigel<sup>®</sup> コートした 60 mm ディッシュ上に播種し、単層膜を形成するまで培養した。そして、顕微鏡観察下、Polaroid PDMC II/OL により、光学顕微鏡写真を撮影した。

#### 2. RT-PCR 法および Western Blot 法を用いた $\beta$ -casein の発現に関する検討

##### 1) Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA は、1-t-, 2-t-, および 3-t-HMECs から RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (QIAGEN) を用いて抽出した。

RT-PCR には、One-step RT-PCR Kit<sup>®</sup> (QIAGEN) を用い、マニフアクチャープロトコールにしたがって 0.5  $\mu$ g の total RNA を含む全量 50  $\mu$ L の反応混合液を調製した。

遺伝子特異的プライマーは、次に示すものを用いた。  $\beta$ -casein sense : 5'-ATGAG GACCAGCAGCAAGGAGA-3' および antisense : 5'-GGAGCAGAGGCAGAGGA AGATG-3'。 RT-PCR 反応スケジュールは、以下の条件で行った。初めに、50  $^{\circ}$ C, 30 分間の逆転写反応、そして 95  $^{\circ}$ C, 15 分間の DNA polymerase 初期活性化ステップを行なった。その後、40 サイクルの cDNA 増幅ステップは、95  $^{\circ}$ C で 45 秒間、60  $^{\circ}$ C で 45 秒間および 72  $^{\circ}$ C で 30 秒間行い、最終エクステンションを 72  $^{\circ}$ C, 10 分間行なった後、解析まで 4  $^{\circ}$ C で保持した。今回のトランスポーター発現の検討では、ハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -actin を用いた。特異的プライマーは次に示すものを用いた。  $\beta$ -actin sense : 5'-ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAG-3' , および antisense : 5'-CGCTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACA-3'。 RT-PCR 反応は、上記の二つのトランスポーターと同様のものを用い、タイムスケジュールは以下の条件で行った。初めに 50  $^{\circ}$ C, 30 分間の逆転写反応、そして 95  $^{\circ}$ C, 15 分間の DNA polymerase 初期活性化ステップ後、95  $^{\circ}$ C で 1 分間、53  $^{\circ}$ C で 1 分間および 72  $^{\circ}$ C で 1 分間からなる 25 サイクルの cDNA 増幅ステップを行い、最終エクステンションを 72  $^{\circ}$ C, 10 分間行なった後、解析まで 4  $^{\circ}$ C で保持した。

RT-PCR 産物は、tris-acetate EDTA buffer 中、2 % agarose gel で電気泳動により検出した。ゲルを ethidium bromide で染色し、UV transilluminater により可視化し、ポラ

ロイドカメラにより撮影した。

## 2) Western blotting

1-t, 2-t, および 3-t-HMEC のそれぞれのサンプルは, 100 mm ディッシュ上で培養した細胞を PBS で 3 回洗い, サンプルバッファー 5 mL で溶解して調製した. サンプルを BCA Protein Assay kit (PIERCE, IL, U.S.A.) によりタンパク定量し, 等量のタンパクを 12.5 % Readygels J (BioRad) に適用し, ゲル電気泳動した. 泳動後, ゲルより電氣的に PVDF メンブレンに 4 °C で 30 V, 16 時間かけて転写した. そして, そのメンブレンを 3 % Gelatin を含む Tris Borate Saline Buffer (TBS, pH8.0) でブロッキングし, さらに 1:1000 で 1 % gelatin を含む TBS に希釈した mouse anti-human  $\beta$ -casein antibody で一晩インキュベートした. その後, 0.1 % Tween を含む TBS で 15 分, 3 回洗浄し, 1:5000 で希釈した horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody (PIERCE) で 2 時間インキュベートした. 次に, 0.1 % Tween を含む TBS で 15 分, 3 回洗浄し, さらに Tween を含む TBS で 15 分, 1 回洗浄した. 目的のタンパク質を検出するために, SuperSignal<sup>®</sup> WestDura Extended Duration Substrate (PIERCE) を用いて発光させ, Image Reader LAS-1000 System (Fujiphoto Film Co., LTD. Tokyo, Japan) により観察した.

## 3. カチオン性およびアニオン性薬物の輸送方向性の検討

1-t, 2-t, および 3-t-HMEC を cell culture insert 上で培養し, 輸送実験に用いた. confluent 到達後の 3-t-HMEC を用いて行った. 透過実験は, apical 側 (A 側; 500  $\mu$ L) から basal 側 (B 側; 1500  $\mu$ L) あるいは B 側から A 側への二つの輸送方向性を比較するため, A 側あるいは B 側のどちらか一方に  $^{14}$ C-TEA あるいは  $^{14}$ C-PAH, および  $^3$ H-mannitol を添加した培地を入れた.  $^{14}$ C-TEA および  $^{14}$ C-PAH のそれぞれの添加濃度は 1  $\mu$ M に設定し, また, paracellular の輸送マーカーである  $^3$ H-mannitol を 20 nM で添加した. 実験中, プレートはインキュベーター内で 37 °C に保ち, サンプルングは, receiver 側から 100  $\mu$ L の培地を採取し, 反応開始後 30 分, 1, 2 および 3 時間に行った. 定量には, 液体シンチレーションカウンター LCS5100 (ALOKA, Tokyo, Japan) を用いた.

モデル薬物および mannitol の見かけの透過係数 ( $P_{app}$ ) は, eq. 1<sup>52)</sup> によって算出した.

$$P_{app} = \frac{[X]_{receiver}}{A \times t \times [C]_{donor}} \cdots \text{eq. 1}$$

$[X]_{receiver}$  :ある時間  $t$  でのモデル薬物または mannitol のレシーバーチャンバー中の累積透過薬物量

$A$  : cell culture insert の有効透過面積

$[C]_{donor}$  :ドナーチャンバー中のモデル薬物または mannitol の濃度

mannitol の透過を内部標準として、モデル薬物の  $P_{app}$  ( $P_{app, model}$ ) を mannitol の  $P_{app}$  ( $P_{app, mannitol}$ ) で除することにより透過係数比 ( $P_{app} \text{ ratio}$ ) を算出した (eq. 2).<sup>67)</sup>

$$P_{app} \text{ ratio} = \frac{P_{app, model}}{P_{app, mannitol}} \cdots \text{eq. 2}$$

#### 4. RT-PCR による hOCT1 と hOCT3 の発現の検討

Total RNA の抽出, RT-PCR およびハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin は、上述した  $\beta$ -casein mRNA の検出と同様の方法に従った。

RT-PCR には、One-step RT-PCR Kit<sup>®</sup> (QIAGEN)を用い、マニユファクチャープロトコールにしたがって 0.5  $\mu$ g の total RNA を含む全量 50  $\mu$ L の反応混合液を調製した。ただし、hOCT1 には Q-solution を加えなかった。特異的プライマーは、次に示すものを用いた。hOCT1 sense : 5'-GATTCCTTTACTCCGCTCTGGTC -3'および antisense : 5'-TTTCTTTGGGCTTTGCTTTTCTCC-3' , また , hOCT3 sense : 5'-GTTTCGCTCTGTTCAGGTCTGTGT-3'および antisense:5'-TTATGTGTTCCCA GAAACTTC-3'。RT-PCR 反応は、Biometra<sup>®</sup> thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) を用いてつぎのタイムスケジュールで行った。50  $^{\circ}$ C, 30 分間の逆転写反応, そして 95  $^{\circ}$ C, 15 分間の DNA polymerase 初期活性化ステップ後, 40 サイクルの cDNA 増幅ステップは, 95  $^{\circ}$ C で 1 分間, 61  $^{\circ}$ C (hOCT3:60  $^{\circ}$ C) で 1 分間および 72  $^{\circ}$ C で 1 分間からなる。最終エクステンションを 72  $^{\circ}$ C, 10 分間行なった後, 解析まで 4  $^{\circ}$ C で保持した。

RT-PCR 産物は、 $\beta$ -casein と同様の方法で撮影した。

## 5. 薬物の乳腺上皮細胞を介した輸送における担体の関与と pH 依存性に関する検討

3-t-HMEC を cell culture insert 上で培養し, confluent 到達後, 輸送実験に用いた. 輸送実験は, TEA および PAH を用いた実験と同様に A 側 (200  $\mu$ L) から B 側 (800  $\mu$ L) あるいは B 側から A 側への二つの輸送方向性を比較するため, A 側あるいは B 側のどちらか一方にモデル薬物である  $^3\text{H}$ -atenolol,  $^3\text{H}$ -cimetidine, あるいは  $^3\text{H}$ -verapamil, および paracellular 輸送マーカーである  $^{14}\text{C}$ -mannitol を添加した isotonic saline buffer を添加した.  $^3\text{H}$ -atenolol,  $^3\text{H}$ -cimetidine, および  $^3\text{H}$ -verapamil のそれぞれの添加濃度は 5, 4, および 1  $\mu\text{M}$  に設定し, また  $^{14}\text{C}$ -mannitol を 1  $\mu\text{M}$  で添加した. サンプルングは, receiver 側から 100  $\mu\text{L}$  の培地を採取し, 実験開始後 20, 40, および 60 分に行った.

モデル薬物および mannitol の  $P_{\text{app}}$ , および  $P_{\text{app}}$  ratio は, 先に述べた eq. 2 で求めた. さらに, さらに, 培養乳腺上皮細胞を介した分配を評価するために  $P_{\text{app}}$  ratio の A 側から B 側方向に対する B 側から A 側方向の比 ((B-A)/(A-B) ratio) を算出した (eq. 3).

$$(B - A / A - B) \text{ratio} = \frac{P_{\text{app}} \text{ratio}_{(B-A)}}{P_{\text{app}} \text{ratio}_{(A-B)}} \cdots \text{eq. 3}$$

## 引用文献

- 1) American Academy of Pediatrics, Work Group on Breastfeeding., *Pediatrics.*, **100**, 1035-1039 (1997).
- 2) Anderson P. O., *Clin. Pharm.*, **10**, 594-624 (1991).
- 3) Kramer M. S., Chalmers B., Hodnett E. D., Sevkovskaya Z., Dzikovich I., Shapiro S., Collet J. P., Vanilovich I., Mezen I., Ducruet T., Shishko G., Zubovich V., Mknuk D., Gluchanina E., Dombrovskiy V., Ustinovitch A., Kot T., Bogdanovich N., Ovchinnikova L., Helsing E., *JAMA.*, **285**, 413-420 (2001).
- 4) American Academy of Pediatrics, Section on Breastfeeding., *Pediatrics*, **115**, 496-506 (2005).
- 5) American Academy of Family Physicians. *AAFP Policy Statement on Breastfeeding*. Leewood K. S., *American Academy of Family Physicians*, 2001.
- 6) American College of Obstetricians and Gynecologists. Breastfeeding: maternal and infant aspects., *ACOG Educational Bulletin Number 258.*, Washington, DC, American College of Obstetricians and Gynecologists, 2000.
- 7) Fifty-Fourth World Health Assembly. *Global Strategy for Infant and Young Child Feeding. The Optimal Duration of Exclusive Breastfeeding*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2001.
- 8) United Nations Children's Fund. *Breastfeeding: Foundation for a Healthy Future*. New York, NY: United Nations Children's Fund; 1999.
- 9) Alan S. R., Zhou W., Andrew A., *Pediatrics.*, **110**, 1103-1109 (2002).
- 10) Hatcher S. L., *Psychiatry.*, **45**, 172-181 (1982).
- 11) Atkinson H. C., Begg E. J., Darlow B. A., *Clin. Pharmacokinet.*, **14**, 217-240 (1988).
- 12) Wilson J. T., Brown R. D., Cherek D. R., Dailey J. W., Hilman B., Jobe P. C., Manno B. R., Redetzki H. M., Stewart J. J., *Clin. Pharmacokinet.*, **5**, 1-66 (1980).
- 13) Wilson J. T., *Drug Metab. Rev.*, **14**, 619-652 (1983).
- 14) Matheson I., *Br. Med. J.*, **290**, 1588-1589 (1985).

- 15) Bennett P. N., *Drugs and Human Lactation*. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- 16) ICH harmonized tripartite Guideline, General Considerations for Clinical trials E8., Available from: URL:<http://www.ich.org/cache/comp/276-254-1.html>
- 17) McNamara P. J., Abbassi M., *Moli. Pharm. Res.*, **21**, 555-566 (2004).
- 18) Ito S., Koren G., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **38**, 99-102 (1994).
- 19) Beaulac-Baillargeon L., Allard G., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **36**, 413-416 (1993).
- 20) Somogyi A., Gugler R., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **7**, 627-629 (1979).
- 21) Oo C. Y., Kuhn R. J., Desai N., McNamara P. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 548-555 (1995).
- 22) William B. W., John W. A., Steaven H. W., Richard D. C., *Obstet. Gynecol.*, **63**, 42S-44S (1984).
- 23) Atkinson H. C., Begg E. J., *Clin. Pharmacokinet.*, **18**, 151-167 (1990).
- 24) Wilson J. T., Brown R. D., Hinson J. L., Dailey J. W., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**, 667-689 (1985).
- 25) Alcorn J., Lu X., Moscow J. A., McNamara P. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 487-496 (2002).
- 26) Gerk P. M., Kuhn R. J., Desai N. S., McNamara P. J., *Pharmacotherapy*, **21**, 669-675 (2001).
- 27) Kobayashi D., Kimura S., Uchiyama R., Ueda H., Kobayashi J., Morimoto Y., (In preparation).
- 28) Kimura S., Morimoto K., Ueda H., Kobayashi D., Kobayashi J., Morimoto Y., *Arch. Pharm. Res.*, (Accepted), December 17, 2005.
- 29) Kimura S., Horii N., Ueda H., Kobayashi D., Kobayashi J., Morimoto Y., (In preparation).
- 30) Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. (2005) Guidance for Industry. Clinical Lactation Studies-Study Design, Data Analysis, and Recommendations for Labeling. Available from: URL: <http://www.fda.gov/cder/guidance/5918dft.htm>
- 31) 加藤隆一, 臨床薬物動態学□ 臨床薬理学・薬物療法の基礎として□, 第二版, 南江堂, 東京.



- 32) Linzell J. L., Peaker M., *J. Physiol.*, **216**, 683-700, (1971).
- 33) Linzell J. L., Peaker M., *J. Physiol.*, **216**, 701-716, (1971).
- 34) Mitoulas L. R., Kent J. C., Cox D. B., Owens R. A., Sherriff J. L., Hartmann P. E., *Br. J. Nutr.*, **88**, 29-37 (2002).
- 35) Alcorn J., McNamara P. J., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **46**, 1831-1836 (2002).
- 36) Gerk P. M., Oo C. Y., Paxton E. W., Moscow J. A., McNamara P. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 175-180 (2001).
- 37) Oo C.Y., Desai R. J., Wright C. E., McNamara P. J., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **40**, 231-236 (1995).
- 38) Obermeyer B. D., Bergstrom R. F., Callaghan J. T., Knadler M. P., Golichowski A., Rubin A., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **47**, 724-30 (1990).
- 39) Kafetzis D. A., Sifas C. A., Georgakopoulos P. A., Papadatos C. J., *Acta. Paediatr. Scand.*, **70**, 285-288 (1981).
- 40) Notarianni L. J., Belk D., Aird S. A., Bennett P. N., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **40**, 333-337 (1995).
- 41) Beaulac-Baillargeon L., Auclair A., Matte L., Gaudreult R. C., Forest J. C., *Drug Invest.*, **7**, 57-62 (1994).
- 42) Fleishaker J. C., Desai N., McNamara P. J., *J. Pharm. Sci.*, **76**, 189-193 (1987).
- 43) Fleishaker J. C., McNamara P. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **244**, 919-924 (1988).
- 44) McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **109**, 149-160 (1991).
- 45) McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D., *Drug Metab. Disp.*, **20**, 302-308 (1992).
- 46) Begg E. J., Atkinson H. C., *Pharmac. Ther.*, **59**, 301-310 (1993).
- 47) Meskin M. S., Lien E. J., *J. Clin. Hosp. Pharm.*, **10**, 269-278 (1985).
- 48) Agatonovic-Kustrin S., Tucker I. G., Zecevic M., Zivanovic L. J., *Anal. Chim. Acta.*, **418**, 181-195 (2000).
- 49) Neville M. C., Morton J., Umemura S., *Pediatr. Clin. North. Am.*, **48**, 35-52 (2001).
- 50) Schmidhauser C., Bissell M. J., Mysers C. A., Casperson G. F., *Proc. Natl. Acad.*

- Sci.*, **87**, 9118-9122, (1990).
- 51) Danielson K. G., Osborn C. J., Durban E. M., Butel J. S., Medina D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3756-3760 (1984).
  - 52) Toddywalla V. S., Kari F. W., Neville M. C., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **280**, 669-676 (1997).
  - 53) Gerk P. M., Moscow J. A., McNamara P. J., *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 691-693 (2003).
  - 54) McNamara P. J., Burgio D., Yoo S. D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 918-923 (1992).
  - 55) Hahm H. A., IP M. M., Darcy K., Black J. D., Shea W. K., Forczek S., Yosimura M., Oka T., *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **26**, 803-814, (1990).
  - 56) Borellini F., Oka T., *Environ. Health Perspect.*, **80**, 88-99, (1989).
  - 57) Shennan D. B., Peaker M., *Physiol. Rev.*, **80**, 925-951 (2000).
  - 58) Kumura H., Tanaka A., Abo Y., Yui S., Shimazaki K., Kobayashi E., Sayama K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2098-2101, (2001).
  - 59) Bork K., Kaiser T., Benes P., *Arzneimittelforschung.*, **50**, 656-658, (2000).
  - 60) Sakata T., Anzai N., Shin H. J., Noshiro R., Hirata T., Yokoyama H., Kanai Y., Endou H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 789-793, (2004).
  - 61) Wu X., Hung W., Ganapathy M. E., Wang H., Kekuda R., Conway S. J., Leibach F. H., Ganapathy V., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **279**, F449-F458, (2000).
  - 62) Pritchard J. B., Miller D. S., *Physiol. Rev.*, **73**, 765-796, (1993).
  - 63) Gorboulev V., Ulzheimer J. C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A. E., Koepsell H., *DNA Cell Biol*, **16**, 871-881, (1997).
  - 64) Verhaagh S., Schweifer N., Barlow D.P., Zwart R., *Genomics.*, **55**, 209-218, (1999).
  - 65) Hasannejad H., Takeda M., Narikawa S., Huang X. L., Enomoto A., Taki K., Niwa T., Jung S. H., Onozato M. L., Tojo A., Endou H., *Eur. J. Pharmacol.*, **499**, 45-51, (2004).
  - 66) Shore P. A., Brodie B. B., Hogben C. A. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **119**,

- 361-369 (1957).
- 67) Marks G. J., Ryan F. M., Hidalgo I. J., Smith P. L., *Gastroenterology*, **100**, suppl, A697, (1991).
  - 68) Fallingborg J., Christensen L. A., Ingelman-Nielsen M., Jacobsen B. A., Abildgaard K., Rasmussen H. H., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **3**, 605-613, (1989).
  - 69) McEwan G. T., Lucas M. L., *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 937-943, (1990).
  - 70) Taylor D. C., Pownall R., Burke W., *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 280-283, (1985).
  - 71) Ansell C., Moore A., Barrie H., *Pediatr. Res.*, **11**, 1177-1179, (1977).
  - 72) Harrison V. C., Peat G., *Br. Med. J.*, **4**, 515-518, (1972).
  - 73) El-Sabban M. E., Sfeir A. J., Daher M. H., Kalaany N. Y., Bassam R.A., Talhouk R. S., *J. Cell Sci.*, **116**, 3531-3541, (2003).
  - 74) Yabuuchi H., Tamai I., Nezu J., Sakamoto K., Oku A., Shimane M., Sai Y., Tsuji A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 768-773, (1999).
  - 75) Kato Y., Sai Y., Yoshida K., Watanabe C., Hirata T., Tsuji A., *Mol. Pharmacol.*, **67**, 734-743, (2005).
  - 76) Wakasugi H., Yano I., Ito T., Hashida, T. Futami T., Nohara R., Sasayama S., Inui K., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**, 123-128, (1998).
  - 77) Xuan W., Lamhonwah A. M., Librach C., Jarvi K., Tein I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **306**, 121-128, (2003).
  - 78) Neuheoff S., Ungell A., Zamora L., Artursson I., *Pharm. Res.*, **20**, 1141-1148 (2003).
  - 79) Jonker J. W., Merino G., Musters S., van Herwaarden A. E., Bolscher E., Wagenaar E., Mesman E., Dale T. C., Schinkel A.H., *Nat. Med.*, **11**, 127-129, (2005).

